

**Phosphattransfer von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
(PAPS) auf p85, ein Membranprotein des Golgiapparates - eine
neue kovalente Proteinmodifikation.**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Chemie und
Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ulrich Seydel

aus Bielefeld

am 16. 5. 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0067

**Phosphattransfer von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
(PAPS) auf p85, ein Membranprotein des Golgiapparates - eine
neue kovalente Proteinmodifikation.**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Chemie und
Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ulrich Seydel

aus Bielefeld

am 16. 5. 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Thoenen
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Abteilung für Neurochemie
Am Klopferspitz 18a
8033 Martinsried

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Guido Hartmann
Ludwig-Maximilians-Universität München
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Karlstraße 23
8000 München 2

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 7. 1988

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1984 im Labor von Herrn Dr. Wieland Huttner am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in Martinsried begonnen, im September 1985 im neuen Labor von Herrn Dr. Huttner am Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie fortgesetzt und dort im April 1988 abgeschlossen.

Danksagungen

Herrn Dr. W.B. Huttner danke ich für unzählige anregende Diskussionen und eine großzügige Ausstattung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. H. Thoenen danke ich für die Betreuung meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. G. Hartmann danke ich für die Betreuung meiner Promotion als Vertreter der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Herrn Prof. Dr. I. H. Segel danke ich für die großzügige Überlassung der aufgereinigten APS-Kinase, ohne die die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. K.E. Howell danke ich für ihre Hilfe bei der subzellulären Lokalisation von p85 und zahlreiche Diskussionen.

Frau Ursula Weiß danke ich für ihre Hilfe, bei dem Versuch monoklonale Antikörper gegen p85 zu erzeugen, und für hilfreiche Kritik bei der Anfertigung dieses Manuskriptes.

Allen Kollegen im Labor danke ich für gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der Erlernung biochemischer und zellbiologischer Arbeitstechniken.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
1. EINLEITUNG	3
1.1. Posttranslationale Modifikation von Proteinen	3
1.1.1. Posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren	4
1.1.2. Voraussetzung für die Modifikation einer Aminosäure	4
1.1.3. Reversibilität von Aminosäuremodifikationen	6
1.2. Sulfatierung von Proteinen	7
1.2.1. Aktivierung von Sulfat	7
1.2.2. Sulfotransferasen	11
1.2.3. Der PAPS-Translokator	14
1.3. Affinitätsmarkierung von Proteinen mit PAPS	15
1.3.1. Markierung mit PAPS-analogen Verbindungen	15
1.3.2. Direkte Photoaffinitätsmarkierung mit PAPS	16
1.3.3. Synthesemöglichkeiten von PAPS-analogen Verbindungen und radioaktiv markiertem PAPS	17
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1. Materialien	20
3.2. Synthese von PAPS mit verschiedenen radioaktiven Resten	20
3.2.1. Synthese von [3'- ³² P]PAPS	20
3.2.2. Synthese von [5'- ³² P]PAPS und [2,5',8- ³ H]PAPS	21
3.2.3. Synthese von [³⁵ S]PAPS	21
3.2.4. Konversion von [3'- ³² P]PAPS zu [3'- ³² P]PAP	22

3.2.5.	Konversion von [5'- ³² P]PAPS zu [5'- ³² P]APS	22
3.2.6.	Analytische und präparative Aufreinigung von PAPS.....	23
3.3.	Proteinanalytische Methoden.....	23
3.3.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	23
3.3.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	23
3.3.3.	Zweidimensionale Elektrophorese (isoelektrische Fokussierung/Polyacrylamidgelelektrophorese).....	24
3.3.4.	Proteintransfer auf Nitrozellulosefilter.....	24
3.3.5.	Elektroelution	25
3.3.6.	Limitierte Proteolyse von radioaktiv markierten Proteinen.....	25
3.3.7.	Tryptischer-chymotryptischer Verdau von radioaktiv markiertem p85.....	26
3.3.8.	Phosphoamino-säureanalyse	26
3.3.9.	Verdau von Glykoproteinen mit Neuraminidase	27
3.3.10.	Behandlung von Proteinen mit NH ₂ OH.....	27
3.4.	Fraktionierung von Geweben und Zelllinien.....	27
3.4.1.	Präparation des 100K-Sedimentes aus Geweben und Zelllinien.....	27
3.4.2.	Präparation des 20K-Sedimentes und der 0.5/1.5M-Interphase.....	28
3.4.3.	Subzelluläre Fraktionierung des Rindernebennierenmarkes.....	28
3.4.4.	Subzelluläre Fraktionierung der Rattenleber.....	29
3.4.5.	Natriumkarbonatbehandlung und Triton X-114 Kondensation	29
3.4.6.	Immunisolierung von p85-haltigen Membranen aus Fraktionen der Rattenleber.....	30
3.5.	Markierung von p85 (Standardassay)	31
3.5.1.	Bestimmung des Zeitverlaufes der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktion	32
3.5.2.	Markierung von p85 in Gelstücken und Analyse der Nukleotide in der Reaktionsmischung.....	32
3.5.3.	Photoaffinitätsmarkierung.....	33
3.6.	Enzymassays	33
3.6.1.	Tyrosylprotein-Sulfotransferase-Assay	33
3.6.2.	Galaktosyltransferase-Assay.....	34

4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION, TEIL 1: SYNTHESE VON PAPS MIT VERSCHIEDENEN RADIOAKTIVEN RESTEN	36
4.1.	Auftrennung und Analyse der Reaktionsprodukte.....	36
4.2.	Synthese von $[3\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$	36
4.3.	Synthese von $[5\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ und $[2,5',8\text{'-}^3\text{H}]\text{PAPS}$	41
4.4.	Synthese von $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$	45
4.5.	Versuch der Synthese von 8-Azido-PAPS	47
4.6.	Diskussion der PAPS-Synthesen.....	48
5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION, TEIL 2: CHARAKTERISIERUNG VON p85	52
5.1.	Entdeckung von p85 in Fraktionen der Rinderneben- niere.....	52
5.1.1.	p85 wird durch $[3\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markiert.....	53
5.2.	Rahmenbedingungen der Markierung von p85.....	58
5.2.1.	Präparation der 0.5/1.5M-Interphase.....	58
5.2.2.	Charakterisierung der Markierungsbedingungen für p85.....	61
5.2.3.	Markierung von p85 bei verschiedenen pH-Werten.....	64
5.2.4.	Stimulierung der Markierung von p85 durch divalente Kationen	66
5.2.5.	Markierung von p85 mit verschiedenen Konzentrationen von PAPS.....	69
5.3.	Biochemische Charakterisierung von p85.....	71
5.3.1.	Isoelektrische Fokussierung von p85.....	71
5.3.2.	Die Markierung von p85 ist PAPS-spezifisch.....	71
5.3.3.	Markierung von p85 mit $[3\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$, $[5\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ und $[2,5',8\text{'-}^3\text{H}]\text{PAPS}$	74
5.3.4.	Charakterisierung der Phosphatbindung.....	78
5.3.5.	Phosphoamino säureanalyse von p85.....	80
5.3.6.	Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen.....	82
5.3.7.	Zeitverlauf der Phosphorylierung von p85.....	84
5.3.8.	Reversibilität der Markierung von p85.....	89



5.3.9.	Markierung von p85 nach SDS-Polyacrylamidgel- elektrophorese.....	90
5.3.10.	Analyse der Reaktionsprodukte.....	92
5.4.	Zellbiologische Charakterisierung von p85.....	96
5.4.1.	p85 ist ein integrales Membranprotein.....	96
5.4.3.	Verdauen von p85 mit Neuraminidase	97
5.4.4.	Verteilung von markiertem p85 in verschiedene sub- zellulären Fraktionen des Rindernebennierenmarkes und der Rattenleber.	100
5.4.5.	Immunisolierung von p85 mit Antikörpern gegen den polymeren IgA-Rezeptor	108
5.4.6.	Orientierung von p85 in der Membran	112
5.4.7.	p85 ist ein weitverbreitetes Protein.....	116
5.4.8.	Menge an phosphoryliertem p85 in den getesteten Rattengeweben und klonalen Zelllinien	124
5.5.	Versuche zur Aufreinigung von p85	126
5.5.1.	Partielle Aufreinigung von p85	128
5.5.2.	Immunisierung von Mäusen mit aufgereinigtem p85	133
5.6.	Diskussion	134
5.6.1.	Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit [3'- ³² P]PAPS...	134
5.6.2.	p85 wird durch Übertragung der 3'-Phosphatgruppe von PAPS phosphoryliert	135
5.6.3.	p85 wird intermediär phosphoryliert.....	136
5.6.4.	Mechanismus der Phosphorylierung von p85.....	139
5.6.5.	Die subzelluläre Lokalisation von p85.....	140
5.6.6.	p85, mehr als eine 3'-Nukleotidase?.....	141
5.6.7.	Aufreinigung von p85	142
5.6.8.	Ausblick.....	142
6.	LITERATUR	143
	Lebenslauf	151

Abkürzungen

APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CoA	Coenzym A
DEAE	Dieethylaminoethyl...
DIDS	(4,4'-Diisothiocyanato-2,2'-disulfonsäure)stilben
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	"high performance liquid chromatography"
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
Mes	2-[N-Morpholin]ethansulfonsäure
MOPS	3-[N-Morpholin]propansulfonsäure
PAP	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphate
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R _f	Retentionsindex
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Zusammenfassung

Das Kosubstrat der Sulfatierung von Proteinen ist 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS). Golgi-Membranproteine, welche an der Sulfatierung von Proteinen beteiligt sind, sollten durch ihre Fähigkeit PAPS zu binden, identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Syntheseweg für PAPS mit verschieden radioaktiv markierten Resten entwickelt. Für diesen Syntheseweg wurden die Sulfat "aktivierenden" Enzyme ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und Pyrophosphatase in hochaufgereinigter Form verwendet. Damit war die Synthese von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$, $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ und $[2,5',8\text{-}^3\text{H}]\text{PAPS}$ möglich.

Wenn partikuläre Fraktionen der Rindernebenniere mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert und anschließend durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert wurden, war ein Protein von 85kDa (p85) die am stärksten markierte Bande. Die Markierung erfolgte auch ohne die Einstrahlung von UV-Licht. Sie erfolgte nicht, wenn die Proteine vor der Markierung durch Kochen oder Trichloressigsäure-Präzipitation denaturiert worden waren. Die Denaturierung von p85 in SDS war pH-abhängig. Nur wenn der pH der Reaktionslösung kleiner als 5.4 war, konnte p85 nicht mehr markiert werden. Die Markierung von p85 mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ war kovalent und erforderte divalente Kationen. Die Menge der an p85 gebundenen Radioaktivität änderte sich nicht in einem Zeitraum von 30 - 90 Sekunden Inkubation mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, wenn der pH-Wert der Reaktionslösung 4.0, 7.0 oder 8.0 betrug. Die halbmaximale Sättigung der Markierung von p85 durch $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ war $10\mu\text{M}$. Wie Konkurrenzversuche mit verschiedenen nicht-radioaktiven Nukleotiden zeigten, war die Markierung von p85 spezifisch für PAPS. Nach der Abspaltung der Sulfatgruppe konnte p85 durch das resultierende $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$ nicht markiert werden. Ferner wurde p85 nicht durch $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$, $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, und $[2,5',8\text{-}^3\text{H}]\text{PAPS}$ markiert. Daraus folgt, daß nur die 3'-Phosphat Gruppe von PAPS kovalent gebunden wird. Chemische Charakterisierung der Phosphatbindung und Phosphoaminosäureanalyse zeigten, daß Serin die phosphorylierte Aminosäure war. Die Phosphorylierung von p85 erfolgte sehr schnell, in weniger als 1 Sekunde. Die Dephosphorylierung von p85 erfolgte nach Zugabe eines 100-fachen Überschusses an nicht-radioaktivem PAPS innerhalb von 2 Sekunden. In beiden Fällen änderte sich die Geschwindigkeit der Reaktion nicht, nachdem die Proben verdünnt

und mit SDS versetzt worden waren. Außerdem führte die Abnahme der PAPS-Konzentration in der Reaktionslösung nach längerer Inkubation durch eine 3'-Nukleotidase zu einer gleichzeitigen Abnahme der Menge an markiertem p85. p85 konnte auch dann noch markiert werden, wenn es durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese partiell aufgereinigt worden war. Außerdem konnte in diesen Proben eine für PAPS spezifische 3'-Nukleotidaseaktivität nachgewiesen werden, jedoch keine Sulfohydrolaseaktivität.

p85 wurde von Natriumkarbonat nicht aus der Membran gelöst und wurde ausschließlich in der Detergenzphase nach Triton X-114 Kondensation gefunden, somit ist es ein integrales Membranprotein. p85 wurde nicht von Chymotrypsin, Trypsin und Pronase angegriffen, selbst wenn die Membranen durch Triton X-100 solubilisiert worden waren. Die Sensitivität von p85 gegenüber Neuraminidase zeigt, daß p85 komplexe Kohlenhydratstrukturen enthält. Die spezifische Aktivität von p85 war nach subzellulärer Fraktionierung von Rindernebenniere und Rattenleber in Golgi angereicherten Fraktionen am höchsten. Wie Immunadsorptionsexperimente mit einem monoklonalen Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil des polymeren IgA-Rezeptors zeigten, befanden sich p85 und der Rezeptor in denselben Zellkompartimenten. Diese sind Vesikel des sekretorischen und transzytotischen Transportweges. Inhibitoren der PAPS-Translokation hatten keinen Einfluß auf die Markierung von p85. Da außerdem die Markierungsgeschwindigkeit von p85 unabhängig von Detergenz war, ist die Bindungsstelle für PAPS von p85 wahrscheinlich zum Zytoplasma orientiert. p85 ist ein weitverbreitetes Protein, das in allen getesteten Ratten- und Rindergeweben und klonalen Zelllinien nachgewiesen werden konnte.

Eine partielle Aufreinigung von p85 aus Rindernebennieren konnte erreicht werden, jedoch gelang es nicht, monoklonale Antikörper gegen p85 mit diesem Material zu produzieren.

p85 ist wahrscheinlich eine für PAPS-spezifische 3'-Nukleotidase, die eine bisher noch nicht erkannte Rolle im zellulären PAPS-Metabolismus spielt.

1. EINLEITUNG

1.1. Posttranslationale Modifikation von Proteinen

Die Primärstruktur eines Proteins ist in der DNA festgelegt. In eukaryontischen Zellen ist die DNA im Zellkern konzentriert. Die ersten Schritte der Umsetzung der genetischen Information in ein Protein finden dort statt. Dabei wird zunächst DNA in RNA übersetzt (Transkription). Diese wird unter Umständen gespleißt, wodurch die Introns entfernt werden, und durch Verkappen des 5'-Endes mit 7-Methylguanosin und Anhängen von poly-Adenosin an das 3'-Ende in die endgültige Form gebracht. Anschließend wird die RNA aus dem Kern transportiert und zu den Orten der Proteinbiosynthese gebracht. An den Ribosomen findet die Synthese des Proteins statt. Dabei wird die Sequenz der Nukleotide in eine Sequenz von Aminosäuren "übersetzt" (Translation).

Bereits während der Proteinbiosynthese kann das entstehende Protein vielfach modifiziert werden. Weitere Modifikationen des Proteins finden nach Abschluß der Proteinbiosynthese statt. Der Einfachheit halber wird hier nicht zwischen diesen Möglichkeiten unterschieden, sondern einheitlich von post-translationaler Modifikation gesprochen. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, ein Protein zu modifizieren:

- 1.) Ein Protein kann mit Ionen, Molekülen (prosthetische Gruppen) oder anderen Proteinen Komplexe bilden. Die Komplexe werden dabei durch elektrostatische Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindung oder van der Waalsche Wechselwirkung zusammengehalten.
- 2.) Peptide von definierter Länge können abgespalten werden. Die limitierte Proteolyse von Proteinen dient unter anderem zur Abspaltung von Signalsequenzen oder der Freisetzung von Hormonen aus größeren Proteinen.
- 3.) Moleküle oder Proteine (z.B. Ubiquitin) können entweder an der Seitenkette von Aminosäuren oder am C- oder N-Terminus eines Proteins kovalent gebunden werden. In seltenen Fällen können Aminosäuren noch vor dem Einbau in das Protein modifiziert werden. Die Formylierung von an t-RNA gebundenem Methionin ist ein Beispiel hierfür (Blanquet et al., 1984).

Die posttranslationalen Modifikationen von Aminosäuren werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.1.1. Posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren

Einige der häufigsten Proteinmodifikationen sind in Abbildung 1 aufgeführt. Bis heute sind weit über 140 Aminosäuremodifikationen bekannt geworden (Wold, 1981). Häufig werden mehrere Aminosäuren eines Proteins modifiziert, dabei können entweder gleichartige oder verschiedene Gruppen eingeführt werden. Außerdem kann die modifizierende Gruppe ihrerseits modifiziert werden: dies wird als sekundäre Modifikation bezeichnet. Sekundäre Modifikationen sind bisher nur von Kohlenhydraten bekannt geworden, obwohl theoretisch auch andere Gruppen sekundär modifiziert werden könnten. Vor allem die Sulfatierung von Kohlenhydraten ist weitverbreitet, wobei verschiedene Kohlenhydrate modifiziert werden können (Green, 1985; Schauer, 1985; Müller und Heilmann, 1984). Dagegen ist die Phosphorylierung von Kohlenhydraten bisher nur bei Mannose beobachtet worden (Kornfeld und Kornfeld, 1985).

1.1.2. Voraussetzung für die Modifikation einer Aminosäure

Damit die kovalente Modifikation einer Aminosäure stattfinden kann, müssen eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt sein:

- 1.) Ein Enzym, das die betreffende Gruppen übertragen kann, muß vorhanden sein. Ferner kann eine Anzahl von "Helferproteinen" notwendig sein. Dies können zum Beispiel Translokatoren sein, die das Kosubstrat der Reaktion in das betreffende Zellkompartiment bringen.
- 2.) Das Enzym, beziehungsweise sein Reaktionszentrum muß sich im selben Kompartiment befinden wie das Substrat (Protein).
- 3.) Die zu übertragende Gruppe muß als chemisch aktivierte Verbindung vorliegen.
- 4.) Die zu modifizierende Aminosäure muß für das modifizierende Enzym frei zugänglich sein.

Modifikation	Phosphorylierung	Sulfatierung	Acylierung
modifizierte Aminosäure	Ser, Thr, Tyr	Tyr, Cys	Gly, Cys, Thr
Enzyme	Proteinkinasen	Tyrosylprotein sulfotransferase	Acyltransferasen
Lokalisation der Enzyme	Zytoplasma, Nukleus, Mitochondrien, Golgi.	trans-Golgi.	Zytoplasma, rauhes ER.
sekundär modifizierbare Modifikationen	nein	nein	nein
Kosubstrat	Adenosintri-phosphat (ATP)	3'-Phospho-madenosin 5'-phosphosulfat (PAPS)	Palmitoyl-, Myristoyl-Koenzym A
Literaturhinweise	Rosen, Krebs, 1982; Corbin, Hardman, 1984.	Huttner, 1987; Huttner, Baeuerle, 1988.	Magee, Courtneidge, 1985; Sefton, Buss, 1987.

Modifikation	ADP-Ribosylierung	N-Glykosylierung	O-Glykosylierung
modifizierte Aminosäure	Arg, Lys, Ser, Asn,.	Asn	Ser, Thr
Enzyme	ADP-ribosyl-transferasen	Oligosaccharyl-transferase	O-Glykosyl-transferase
Lokalisation der Enzyme	Zytoplasma, Nukleus, Mitochondrien.	rauhes ER. Golgi.	ER,
sekundär modifizierbare Modifikationen	ja	ja	ja
Kosubstrat	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD)	Dolicholphosphat oligosaccharid	Nucleosid-mono- oder diphosphat-monosaccharide
Literaturhinweise	Ueda, Hayaishua, 1985; Althaus, Richter, 1987.	Hubbard, Ivatt, 1981; Kornfeld, Kornfeld, 1985.	Kornfeld, Kornfeld, 1980.

Abbildung 1

Eigenschaften verschiedener, weitverbreiteter, kovalenter Protein-modifikationen.

- 5.) Das Protein muß eine bestimmte räumliche Struktur und eine bestimmte durch die Aminosäuren bedingte Verteilung von Elektronen besitzen, damit das Enzym präzise binden kann. In manchen Fällen wird die Bindungsstelle des Enzyms in der Primärstruktur des Proteins als sogenannte Konsensussequenz erkennbar.

Diese Voraussetzungen müssen unbedingt erfüllt sein, damit eine Aminosäure modifiziert werden kann. Deshalb wird nicht jede Aminosäure, welche modifiziert werden könnte, tatsächlich modifiziert. Dies kann eintreten, wenn die Aminosäure im Inneren eines Proteins liegt oder wenn die Struktur des Proteins die Bindung des modifizierenden Enzymes nicht erlaubt. Zusätzlich können Proteine von der Modifikation ausgeschlossen sein, weil das Enzym nur in einem speziellen Organell vorkommt. Dies trifft auf die Modifikationen, welche im Golgi-Komplexe stattfinden, zu. So können auch zytoplasmatische Proteine an Tyrosin sulfatiert werden, wenn eine Gewebefraktion mit Triton X-100 behandelt wird. Danach wird vor allem Tubulin sulfatiert (Lee und Huttner, 1985).

1.1.3. Reversibilität von Aminosäuremodifikationen

Posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren können in Hinsicht auf ihre Lebensdauer in zwei Gruppen aufgeteilt werden:

- 1.) Bei irreversiblen Modifikationen ist die Lebensdauer der Modifikation mindestens so lang wie die Lebensdauer des betreffenden Proteins. Beispiele für irreversible Modifikationen sind die Sulfatierung von Tyrosin (Huttner, 1987) und die N-Glykosylierung (Kornfeld und Kornfeld, 1985).
- 2.) Im Gegensatz dazu ist die Lebensdauer einer reversiblen Modifikation kürzer, als die Lebensdauer des betreffenden Proteins. Dadurch kann ein Protein während seiner Lebensdauer mehrmals an der selben Aminosäure modifiziert werden.

Die reversible Modifikation von Aminosäuren kann wiederum in zwei Gruppen aufgeteilt werden:

- 1.) Die Abspaltung der modifizierenden Gruppe erfolgt durch ein spezifisches Enzym. Dieses Enzym ist ein Antagonist des modifizierenden Enzymes. Durch die Regulation der Aktivität beider Enzyme kann eine

bestimmte Konzentration des modifizierten Proteins in der Zelle eingestellt werden. Dies wird vor allem zur Regulation zellulärer Prozesse genutzt, wobei die modifizierte, beziehungsweise nicht modifizierte Form des Proteins, unterschiedlichen Funktionszuständen entsprechen. Beispiele hierfür sind:

- 1) Regulation von Enzymaktivitäten: Phosphorylierung im Zytoplasma (Rosen und Krebs, 1982) und ADP-Ribosylierung (Althaus und Richter, 1987).
 - 2.) Bindung an einen Rezeptor: Mannose-6-phosphorylierung (Figura und Hasilik, 1986).
 - 3.) Verankerung in der Membran: Bindung von Glykosylphosphatidylinositol (Low et al., 1986).
- 2.) Im Gegensatz dazu stehen Reaktionsintermediate. Hier erfolgt die Bindung einer Gruppe im Verlauf einer Reaktion und betrifft nur das Enzym, welches die Reaktion durchführt. Dabei wird das Reaktionszentrum blockiert. Das Enzym kann erst nach Abspaltung der Gruppe erneut reagieren. Sowohl die Bindung als auch die Abspaltung der modifizierenden Gruppe erfolgt ohne die Hilfe externer Enzyme "autokatalytisch". Beispiele für Reaktionsintermediate sind:
- 1.) Bindung eines Proteins: Serinproteasen (Karlson, 1984).
 - 2.) Bindung von DNA: DNA-Topoisomerasen (Tse et al., 1980).
 - 3.) Bindung von Phosphat: Transport-ATPasen (Hokin et al., 1965).

Ob Reaktionsintermediate nur einen notwendigen Schritt während einer Reaktion darstellen oder ob sie auch weitergehende Funktionen haben, ist noch unklar.

1.2. Sulfatierung von Proteinen

1.2.1. Aktivierung von Sulfat

Das Kosubstrat der Sulfatierung ist 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS). Die Struktur von PAPS wurde 1957 aufgeklärt (Lipmann und Robbins, 1957) und noch im selben Jahr durch chemische Synthese bestätigt (Baddiley et al., 1957) (Abbildung 2).

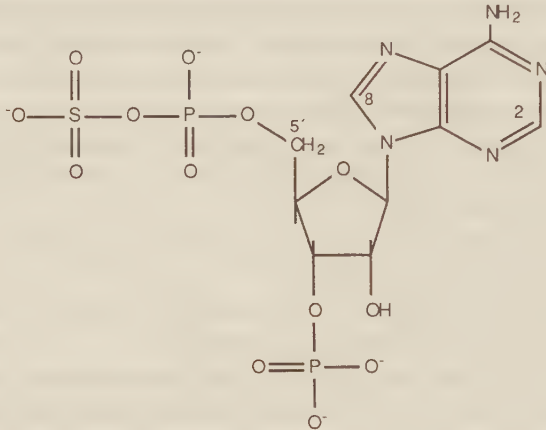
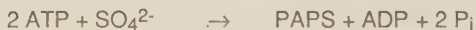
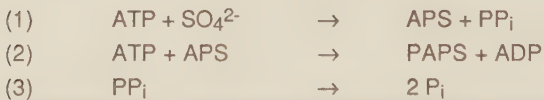


Abbildung 2: 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS)

Charakteristisch für PAPS ist die Phosphatgruppe am Ribosering in 3'-Stellung. Die einzig vergleichbare Nukleotidverbindung mit einem Phosphat am Ribosering in 3'-Stellung ist Coenzym A. Im Gegensatz dazu ist die Phosphatgruppe am Ribosering von NADP⁺ in 2'-Stellung gebunden.

Die Synthese von PAPS erfolgt im Zytoplasma in einer Zweistufenreaktion (Abbildung 3, Seite 9).



Im ersten Schritt entsteht, katalysiert durch ATP-Sulfurylase, aus Sulfat und ATP Adenosin 5'-phosphosulfat (APS) und Pyrophosphat (1). Im zweiten Schritt wird APS durch APS-Kinase in der 3'-Position des Riboseringes unter Verbrauch eines weiteren Moleküls ATP phosphoryliert, wodurch PAPS entsteht (2). In einer Nebenreaktion wird Pyrophosphat durch anorganische Pyrophosphatase in 2 Moleküle Phosphat gespalten(3). Insgesamt entstehen

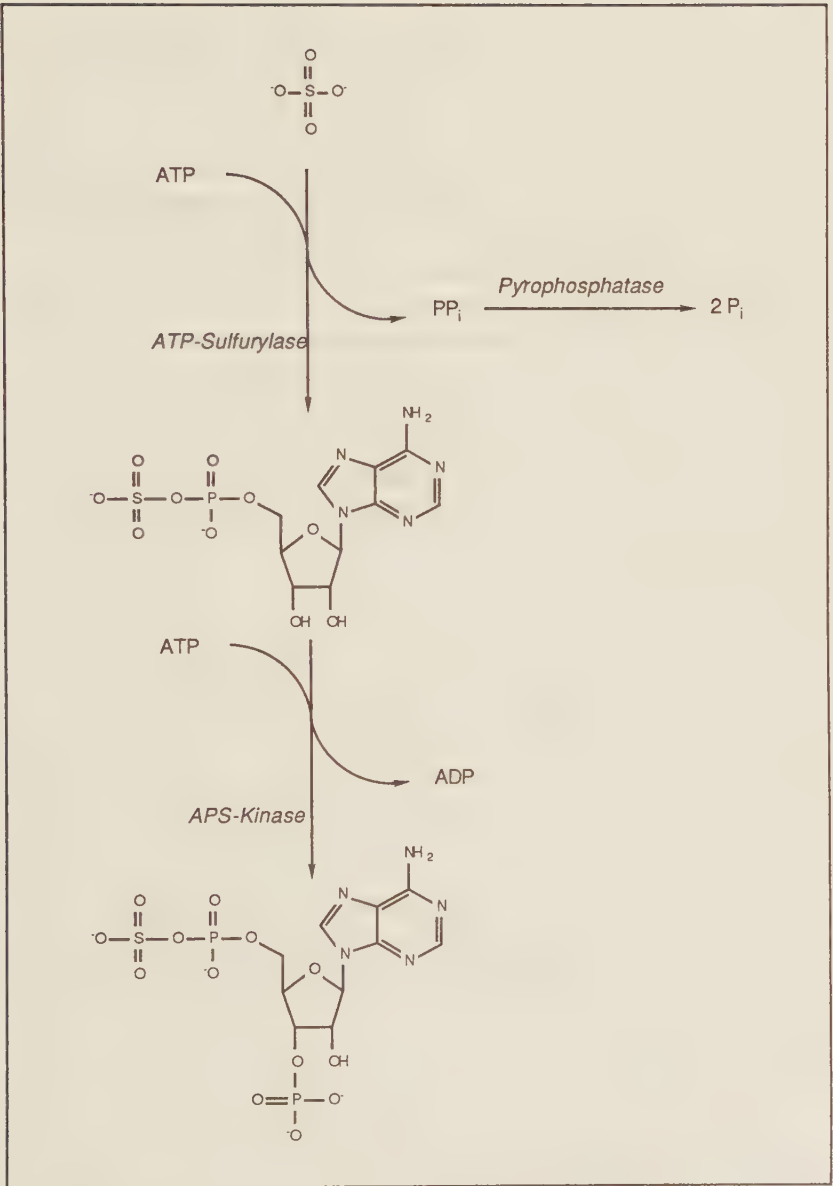


Abbildung 3

Biosynthese von PAPS

aus zwei Molekülen ATP und einem Molekül Sulfat ein Molekül PAPS, ein Molekül ADP und zwei Moleküle Phosphat.

Die Enzyme ATP-Sulfurylase und APS-Kinase wurden in allen eukaryontischen und vielen prokaryontischen Zellen nachgewiesen. Nur einigen Bakterien fehlt die APS-Kinase (Schiff und Hodson, 1973). Beide Enzyme wurden hoch aufgereinigt. Dabei wurde ATP-Sulfurylase am höchsten aufgereinigt aus Rattenleber (Burnell und Roy, 1978), *Nictobacter agilis* (Varma et al., 1971) und *Penicillium chrysogenum* (Tweedie et al., 1971). Hingegen ist APS-Kinase bisher nur aus *Penicillium chrysogenum* zur Homogenität aufgereinigt worden (Renosto et al., 1984). So wurden die Daten der detailliertesten Charakterisierung des gesamten Enzymsystems mit den Enzymen aus *Penicillium chrysogenum* gewonnen (Seubert et al., 1983; Renosto et al., 1984; Daley et al., 1986). Bei diesen Versuchen stammte jedoch die Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, daß das Gleichgewicht der ersten Reaktion sehr weit auf der linken Seite liegt. Das durch die Reaktion erzeugte APS hat eine starke Affinität für die ATP-Sulfurylase. Dabei ist der K_m -Wert der ATP-Sulfurylase für APS und Pyrophosphat kleiner als $1\mu\text{M}$, während der K_m -Wert für ATP und Sulfat $150 - 360\mu\text{M}$ beträgt (Seubert et al., 1983). Deshalb ist APS in der Abwesenheit von Pyrophosphat ein wirksamer Inhibitor der ATP-Sulfurylase. Außerdem kann APS auch die APS-Kinase inhibieren (Renosto et al., 1984). Die nach der Synthese von APS folgende Phosphorylierung von APS zu PAPS und die Hydrolyse von Pyrophosphat sind notwendig, um ausreichende Mengen an "aktiviertem" Sulfat zu synthetisieren. Erst in Anwesenheit von APS-Kinase und Pyrophosphatase entstehen nennenswerte Mengen an PAPS (Seubert et al., 1983). Durch die Phosphorylierung von APS zu PAPS kommt es nicht zu der Akkumulation von APS während der Reaktion, wodurch eine Inhibition der Enzyme verhindert wird.

Die Phosphosulfatbindung besitzt ein sehr hohes Gruppenübertragungspotential, von ca. 80 kJ/mol . Im Vergleich dazu beträgt das Gruppenübertragungspotential der γ -Phosphatgruppe von ATP ca. 35 kJ/mol . Die Phosphosulfatbindung ist sehr säurelabil. Die Halbwertszeit der Phosphosulfatgruppe beträgt $6 - 9$ Minuten bei 37°C in 0.1N HCl ($\text{pH } 1$). Dem gegenüber ist nach 1 Stunde bei 37°C in 0.1N KOH noch keine wesentliche Hydro-

lyse festzustellen (Robbins und Lipmann, 1957). Im Gegensatz dazu sind die Phosphatgruppen relativ säurestabil. Die 3'-Phosphatgruppe kann nicht-enzymatisch durch Erhitzen auf 100°C für 30 Minuten in 1N HCl abgespalten werden. Unter diesen Bedingungen ist die 5'-Phosphatgruppe noch weitgehend unhydrolysiert. Enzymatisch kann PAPS durch zwei Klassen von Enzymen abgebaut werden, entweder durch unspezifische oder durch PAPS-spezifische 3'-Nukleotidasen, oder durch Sulfohydrolasen, die die Sulfatgruppe auf Wasser übertragen. Unspezifische 3'-Nukleotidasen (z.B. Nuclease P1) akzeptieren jedes Nukleotid, welches eine 3'-Phosphatgruppe trägt. Sie sind überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. 3'-Nukleotidaseaktivität wurde jedoch auch in mikrosomalen Fraktionen beobachtet, wobei allerdings nicht geklärt wurde, ob diese Nukleotidase Aktivität für PAPS spezifisch war oder nicht (Lewis und Spencer, 1962). Eine spezifische 3'-Nukleotidase und eine Sulfohydrolase wurden im Zytoplasma von Rinderleber identifiziert und charakterisiert (Denner et al., 1973). Welche Rolle diese Enzyme im Rahmen des PAPS-Metabolismus spielen, ist noch unklar.

1.2.2. Sulfotransferasen

Als Sulfotransferasen bezeichnet man Enzyme, welche Sulfat von PAPS auf verschiedene Akzeptoren übertragen. Dabei kann zwischen Sulfotransferasen, die niedermolekulare Substrate akzeptieren, und Sulfotransferasen, die höhermolekulare Substrate akzeptieren unterschieden werden (Abbildung 4, Seite 12). Bei den Sulfotransferasen, die niedermolekulare Substrate verwenden, handelt es sich um lösliche Proteine, die in zytoplasmatischen Fraktionen nach Zell- oder Gewebefraktionierungen gefunden werden. Im Gegensatz dazu sind die Sulfotransferasen, welche höhermolekulare Substrate verwenden, an Membranen gebunden und im Golgi-Komplex lokalisiert. Im folgenden werden nur diese Golgi-Sulfotransferasen näher beschrieben, eine nähere Beschreibung der anderen Sulfotransferasen würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

Sulfotrans- ferase	Lokalisation	Akzeptor	Beispiel	Literatur
Phenol-	Zytoplasma	Tyrosin- derivate	Dopamin 4 Methylum- belliferon Tyrosinmethylester	Roy, 1981
Steroid-	Zytoplasma	Steroid- hormone	Estron Testeron Cortisol	Roy, 1981
		Gallen- säuren	Taurocholsäure Glykocholsäure	Roy, 1981
Kohlenhydrat-	Golgi	Cerebroside	Galaktose	Karlson, 1984
	Golgi	Glycosamine	Iduronsäure Glucosamin Neuraminsäure N-Acetyl- galactosamin	Müller, Heilmann, 1984 Schauer, 1985 Green, 1985
Protein	Golgi	Aminosäure	Tyrosin	Huttner, 1987

Abbildung 4

Eigenschaften verschiedener Sulfotransferasen.

Die Lokalisation der Golgi-Sulfotransferasen wurde durch folgende Methoden bestimmt:

- 1.) Autoradiographie elektronenmikroskopischer Gewebedünnschnitte von Ratten und Mäusen, die 5 - 7 Minuten nach der Injektion von [^{35}S]Sulfat getötet worden waren, zeigten, daß im wesentlichen nur der Golgi-Komplex radioaktives Material enthielt (Young, 1973; Fatemi und Leblond, 1985).
- 2.) Nach subzellulärer Fraktionierung von Geweben komigrierte die Sulfotransferaseaktivität mit Leitenzymen des Golgi-Komplexes (Farrell und McKann, 1971; Fleischer und Zambano, 1974; Lee und Huttner, 1985).
- 3.) Kinetische Studien mit sekretorischem IgM als Modellprotein zeigten, daß die Tyrosinsulfatierung im gleichen Zellkompartiment wie die Übertragung von Galaktose und Sialinsäure auf an Asparagin gebundene Kohlenhydratstrukturen erfolgte. Dieses Zellkompartiment ist der trans-Golgi (Baeuerle und Huttner, 1987).

Jedoch konnten Glycosaminoglycan-Sulfotransferasen nicht nur im Golgi-Komplex, sondern auch im Serum nachgewiesen werden (Inuoue et al., 1986). Dies ähnelt der subzellulären Verteilung von Galaktosyltransferase, dem klassischen Leitenzym des Golgi-Komplexes, die im Golgi-Komplex und als lösliches Protein im Serum nachgewiesen werden konnte (Strous, 1986).

Über die Golgi-Sulfotransferasen ist recht wenig bekannt, da bis vor kurzem noch keine zur Homogenität aufgereinigt worden war. Erst 1988 wurde die Aufreinigung einer N-Heperansulfotransferase berichtet (Brandan und Hirschberg, 1988). Die vorläufige Charakterisierung dieser Sulfotransferase ergab, daß sie spezifisch nur die Aminogruppe von Glucosamin in Heparan-sulfat sulfatiert, nicht aber andere Glycosamine oder Tyrosin. Damit scheint sich die Vermutung zu bestätigen, daß für jedes Substrat eine spezifische Sulfotransferase existiert (Sulfatide: McKhann et al., 1965; O-gebundene Glycoside: Miller und Waechter, 1979; N-gebundene Glycoside: Merkle und Heifetz, 1984; Glycosamine: Inuoue et al., 1986; Tyrosin: Lee und Huttner, 1985). Im Gegensatz zu der Vielzahl von sulfatierbaren Kohlenhydraten scheint die Sulfatierung einer Aminosäure auf Tyrosin beschränkt zu sein (Huttner, 1987). Bisher wurde in Eukaryonten keine weitere sulfatierte Aminosäure gefunden. Nur in *Escherichia coli* wurde gezeigt, daß Thioredoxin an Cystein sulfatiert wird (Piget und Conley, 1978).

Die Protein-Sulfatierung erfolgt im Lumen des Golgi-Komplexes (Tennekoon et al., 1983; Lee und Huttner, 1985). Wie zu erwarten ist, befindet sich auch die aktive Bindungsstelle für das zu sulfatierende Substrat auf der luminalen Seite der Golgi-Membran. Hingegen wurde bis heute noch nicht gezeigt, auf welcher Seite der Golgi-Membran die Bindungsstelle für das Kosubstrat der Sulfatierung, PAPS, liegt. Da jedoch Glycosamin-Sulfotransferasen in aktiver Form nicht nur im Golgi-Komplex, sondern auch im Serum gefunden wurden, liegt es nahe zu vermuten, daß auch die Bindungsstelle für PAPS auf der luminalen Seite der Golgi-Membran liegt.

1.2.3. Der PAPS-Translokator.

Da PAPS im Zytoplasma synthetisiert wird, jedoch das zu sulfatierende Substrat sich im Lumen des Golgi-Komplexes befindet, besteht das topologische Problem, wie das Kosubstrat zum Substrat kommt.

Aller Wahrscheinlichkeit nach gibt es einen Translokator, welcher durch aktiven Transport PAPS in das Lumen des Golgi-Komplexes transportiert. Hinweise auf einen PAPS-Translokator ergaben sich durch Versuche mit an Golgi-Vesikeln angereicherten Fraktionen der Rattenleber. Bei diesen Versuchen wurde nach Inkubation mit radioaktiven PAPS und anschließender Zentrifugation die Akkumulation von Radioaktivität in Membransedimenten unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. So wurde gefunden, daß die Translokation von PAPS temperaturabhängig ist, gesättigt werden kann und durch die Einwirkung von Proteasen reduziert wird: alles Hinweise auf einen aktiven Transport. Zusätzlich war die Translokation spezifisch für PAPS. Andere Nukleotide, mit der Ausnahme von PAP, konnten nicht mit PAPS konkurrieren (Schwarz et al., 1984).

Der Chemismus der Translokation und die Natur des Translokators sind noch weitgehend unbekannt. Das Modell eines Antiportes von PAPS gegen 3'-AMP wurde von der Gruppe von Hirschberg vorgeschlagen (Capasso und Hirschberg, 1984 a). Auf Grund der vorliegenden Daten können jedoch andere Modelle noch nicht ausgeschlossen werden. Erst die Identifizierung und Charakterisierung des PAPS-Translokators wird ein endgültiges Modell ermöglichen.

1.3. Affinitätsmarkierung von Proteinen mit PAPS

Den Sulfotransferasen und dem vermuteten PAPS-Translokator ist gemein, daß sie PAPS binden können. Daher liegt es nahe, die genannten Proteine durch Affinitätsmarkierung mit PAPS zu identifizieren. Grundsätzlich bestehen dafür zwei Möglichkeiten:

- 1.) indirekte Markierung mit PAPS-analogen Verbindungen
- 2.) direkte Photoaffinitätsmarkierung mit PAPS.

1.3.1. Markierung mit PAPS-analogen Verbindungen

PAPS-analoge Verbindungen, welche für eine indirekte Markierung verwendet werden könnten, müssten gegenüber PAPS chemisch aktiviert werden. Dies kann entweder durch die Einführung sehr reaktiver Gruppen oder durch die Einführung photoaktivierbarer Gruppen geschehen. Ein Beispiel für den ersten Fall ist 5'-(4-Fluorsulfonylbenzoyl)adenosin (FSBA) (Abbildung 5). Die reaktive Gruppe dieser Verbindung ist der Fluorsulfonylrest, der bestimmte Aminosäuren elektrophil angreifen kann (Pal et al., 1975).

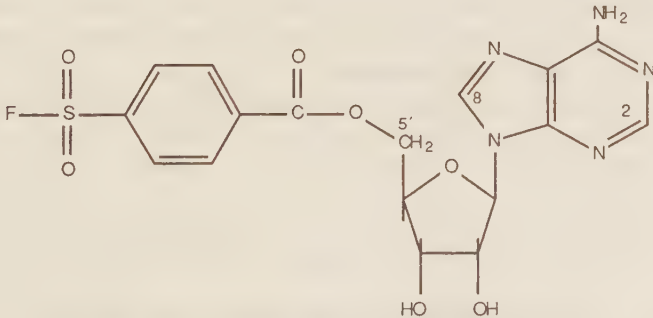


Abbildung 5: 5'-(4-Fluorsulfonylbenzoyl)adenosin (FSBA)

Um als PAPS-analoge Verbindung verwendet werden zu können, müßte FSBA in der 3'-Stellung des Riboseringes phosphoryliert werden.

8-Azidoadeninverbindungen sind Beispiele für photoaktivierbare Verbindungen (Czarnecki et al., 1979) (Abbildung 6).

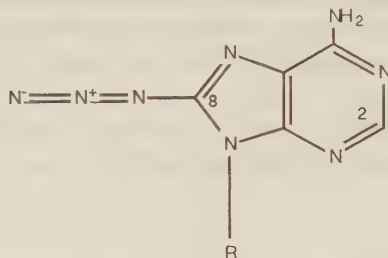


Abbildung 6: 8-N₃-adenin

8-Azidoadeninverbindungen spalten unter der Einwirkung von UV-Licht Stickstoff ab, wobei ein hochreaktives Nitren erzeugt wird, welches mit benachbarten Aminosäuren reagieren kann. Bisher ist 8-Azido-PAPS noch nicht synthetisiert worden.

Der Vorteil des indirekten Markierens unter Verwendung analoger Verbindungen ist, daß die Reaktion mit dem Protein mit hoher Ausbeute verläuft. Dadurch wird der Nachweis wenig abundanter Proteine wesentlich erleichtert. Als Nachteile stehen dem gegenüber:

- 1.) Die Einführung der reaktiven oder photoaktivierbaren Gruppe kann die Bindung an das gewünschte Substrat entweder be- oder verhindern.
- 2.) Die Synthese der radioaktiv markierten Verbindungen kann mühsam sein.

1.3.2. Direkte Photoaffinitätsmarkierung mit PAPS

Für die direkte Photoaffinitätsmarkierung könnte ein chemisch nicht modifiziertes PAPS verwendet werden. Das Prinzip der direkten Photoaffinitätsmarkierung ist, die Elektronen des Purinringes durch die Einstrahlung von UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254nm anzuregen und dadurch eine Reaktion des Purinringes mit benachbarten Aminosäuren zu ermöglichen. Die direkte Photoaffinitätsmarkierung wurde Anfang der sechziger Jahre entwickelt, um

DNA-bindende Proteine kovalent an Nukleinsäuren zu binden und so zu identifizieren (Smith, 1962; Alexander und Moroson, 1962). Seit Mitte der siebziger Jahre wird diese Methode auch zur Charakterisierung von Proteinen, die Nukleotide binden, verwendet (Antonoff und Ferguson 1974, Sperling, 1976; Yue und Schimmel, 1977; Rohrback und Bodley, 1977).

Über den Ablauf der Photoreaktion ist wenig bekannt. Die Reaktion erfolgt vermutlich durch Substitution zwischen dem N-7 und C-8 Atom. Das Endprodukt ist aller Wahrscheinlichkeit nach über den Kohlenstoff in 8-Stellung gebunden (Shetlar, 1980). Welche Aminosäure reagiert, ist abhängig von der Struktur der Bindungsstelle und ist bisher nur in Einzelfällen bestimmt worden (Yue und Schimmel, 1977; Rohrback und Bodley, 1977). Die Höhe der Ausbeute kann sehr stark schwanken. So ergab die direkte Photoaffinitätsmarkierung von aufgereinigter Aminoacyl-t-RNA Synthase mit [γ - ^{32}P]ATP eine Ausbeute von 15% gebundenem Nukleotid (Yue und Schimmel, 1977). Im Gegensatz dazu ergab die Markierung von Zell-Lysaten von *E. coli* mit [α - ^{32}P]ATP nur 2 - 3% Ausbeute an gebundenem Nukleotid (Banks und Sedgwick, 1986).

Der größte Nachteil des direkten Photoaffinitätsmarkierens ist, daß zum Nachweis sehr wenig abundanter Proteine in wenig aufgereinigten Fraktionen eine sehr hohe spezifische Radioaktivität des Nukleotides benötigt wird, da die Ausbeute an markiertem Protein vermutlich gering ist. Der große Vorteil des direkten Photoaffinitätsmarkierens ist die Möglichkeit, das nicht modifizierte Nukleotid, in diesem Fall PAPS, verwenden zu können.

1.3.3. Synthesemöglichkeiten von PAPS-analogen Verbindungen und radioaktiv markiertem PAPS

Die Entscheidung, welche Methode zur Identifizierung von PAPS-bindenden Proteinen verwendet werden kann, hängt von den Möglichkeiten ab, die entsprechenden Verbindungen zu synthetisieren.

Eine Synthese von PAPS-analogen Verbindungen ist noch nicht beschrieben worden (März 1988). Die einfachste Möglichkeit, eine PAPS-analoge Verbindung zu synthetisieren, wäre die Synthese von 8-Azido-PAPS unter Verwendung der drei Enzyme der PAPS-Synthese, APS-Kinase, ATP-Sulfurylase

und Pyrophosphatase. Die Voraussetzung für den Erfolg dieses Syntheseweges ist jedoch, daß sowohl ATP-Sulfurylase als auch APS-Kinase 8-Azido-ATP bzw. 8-Azido-APS als Substrat akzeptieren müssen. Chemische Synthesen von PAPS-analogen Verbindungen können nicht in einfacher Weise von bereits beschriebenen Synthesen anderer Nukleotide abgeleitet werden. Die Synthese wird vor allem durch zwei Umstände erschwert:

- 1.) Die Labilität der Phosphosulfatbindung muß berücksichtigt werden.
- 2.) Die nicht enzymatische Einführung der Phosphatgruppe in die 3'-Position des Riboseringes ist schwierig.

Im Gegensatz dazu scheint die Synthese von radioaktivem PAPS mit hoher spezifischer Aktivität relativ einfach zu sein. [^{35}S]PAPS kann bereits mit hoher spezifischer Aktivität gekauft werden. Jedoch sprechen zwei Gründe gegen die Verwendung von [^{35}S]PAPS in Photoaffinitätsexperimenten:

- 1.) Die Sulfatgruppe kann im Laufe des Experimentes auf geeignete Akzeptoren übertragen werden, wodurch ein hoher Hintergrund entstehen kann. Durch diesen Hintergrund können durch UV-Einstrahlung erzeugte Banden maskiert werden.
- 2.) [^{35}S]Sulfat ist ein eher schwacher β -Strahler ($E_{\text{max}} = 0.156 \text{ MeV}$), wodurch schwache Banden von wenig abundanten Proteinen unter Umständen im Hintergrund verschwinden können.

Aus mehreren Gründen scheint die beste Alternative zu [^{35}S]PAPS [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS zu sein:

- 1.) [^{32}P]Phosphat ist ein harter β -Strahler ($E_{\text{max}} = 1.709 \text{ MeV}$), wodurch die Nachweisgrenze für schwache Banden abgesenkt wird.
- 2.) Die Synthese von [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS ist, im Prinzip, noch einfacher als die Synthese von [^{35}S]PAPS, da nur der letzte Schritt der PAPS-Synthese, die Phosphorylierung von APS durch APS-Kinase, zur Darstellung von [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS notwendig ist. Anstelle von ATP wird [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP verwendet (Abbildung 3, Seite 9).

Wegen der relativ einfachen Synthese von [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS mit hoher spezifischer Aktivität, erschien die direkte Photoaffinitätsmarkierung zur Identifizierung von PAPS-bindenden Golgi-Membranproteinen als der einfachere Weg.

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Ziele der Doktorarbeit waren:

- 1.) Ein Syntheseweg für $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, mit hoher spezifischer Aktivität, sollte entwickelt werden. Dieser Weg sollte auch die Synthese von PAPS mit anderen radioaktiven Resten ermöglichen.
- 2.) $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ sollte benutzt werden, um PAPS-bindende Golgi-Membranproteine zu identifizieren.
- 3.) Diese Proteine sollten nach biochemischen und zellbiologischen Gesichtspunkten charakterisiert werden.
- 4.) Eine Aufreinigung der PAPS-bindenden Proteine sollte angestrebt werden, um die Produktion von Antikörpern zu ermöglichen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Materialien

Radioaktives Material: Isotope wurden entweder von Amersham (Braunschweig) oder NEN (Dreieich) gekauft: [γ - ^{32}P]ATP, 185TBq/mmol; [α - ^{32}P]ATP, 111TBq/mmol; [2,5',8- ^3H]ATP, 1.67TBq/mmol; [^{35}S]Sulfat, 55TBq/mmol (trägerfrei).

Szintillationscocktails: Für die Flüssigszintillationszählung wurden Ready Safe™ (Beckman), Aqualuma (Baker), oder rotiszint 11 (Roth) verwendet.

Enzyme: Chymotrypsin (aus Rinderpankreas), Endoproteinase Glu-C (aus *Staphylococcus V8*), Nuclease P1 (aus *Penicillium citrinum*), Pronase (aus *Streptomyces griseus*), anorganische Pyrophosphatase (aus Hefe) als Suspension in Ammoniumsulfat und Trypsin (aus Rinderpankreas) wurden von Boehringer Mannheim bezogen. ATP-Sulfurylase (aus Brauherfe), Neuraminidase (aus *Clostridium perfringens*) und anorganische Pyrophosphatase als Lyophilisat (aus Bäckerhefe) wurden von Sigma bezogen.

Feinchemikalien: ATP, APS, 5'-AMP, 3'-AMP, PAP, PAPS, DIDS und Atractyloside wurden von Sigma gekauft. BSA, c-AMP und Palmitoyl-CoenzymA stammten von Boehringer Mannheim. Die Ampholine (pH Bereich, 3.5-9.5; 5-7) wurden von LKB gekauft.

Sonstiges: Sonstige Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Sigma (St.Louis) oder Serva (Heidelberg) bezogen, sie waren von der höchsten Reinheit. Die Molekulargewichtsstandards für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden von Pharmacia (Freiburg) bezogen. Die Lösung für den Coomassie-Blau Bindungsassay, zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford 1976), wurde von Biorad (München) gekauft.

3.2. Synthese von PAPS mit verschiedenen radioaktiven Resten

3.2.1. Synthese von [3 '- ^{32}P]PAPS

[3 '- ^{32}P]PAPS wurde durch Phosphorylierung von APS in der 3'-Position des Riboseringes hergestellt (Lee et al., 1984). Die Reaktion wurde durch APS-Kinase aus *Penicillium chrysogenum* katalysiert. Die Reaktionsbedingungen wurden aus einem analytischen APS-Kinase-Assay entwickelt (Renosto et al., 1984).

Die Reaktionsmischung bestand aus: 100mM Tris/HCl (pH 8.0), 10mM MgCl₂, 100 mM [NH₄]₂SO₄, 50μM MgATP (aus einer vorgemischten Lösung bestehend aus 50mM Na₂ATP, 50 mM MgCl₂, 150mM Tris als freie Base), 1μM (37MBq) oder 2μM (74MBq) [γ-³²P]ATP (~185TBq/mmol) und 40μl APS-Kinase Lösung (40mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.2U, 12 μg Protein) (Endkonzentrationen). Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 200μl. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30°C 1 Stunde lang inkubiert. 500μM APS wurden wiederholt (20mal) während der Reaktion zugesetzt. Insgesamt wurden 20nmol APS zugesetzt, die in einem Zeitabstand von 3 Minuten in Portionen von 2μl der Reaktionslösung hinzugefügt wurden. Am Ende der Reaktion betrug das Reaktionsvolumen 240μl. Das Reaktionsprodukt wurde durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) aufgereinigt. Die Ausbeute nach der Aufreinigung war mehr als 80% [3'-³²P]PAPS mit einer spezifischen Aktivität von 3.7TBq/mmol oder 7.4TBq/mmol.

3.2.2. Synthese von [5'-³²P]PAPS und [2,5',8-³H]PAPS

[5'-³²P]PAPS und [2,5',8-³H]PAPS wurden aus ATP und Sulfat durch Inkubation in Gegenwart von ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und anorganischer Pyrophosphatase hergestellt.

Es wurden entweder 50μM MgATP (aus einer vorgemischten Lösung bestehend aus 50mM Na₂ATP, 50mM MgCl₂, 150mM Tris als freie Base) und 1.5μM (37MBq) [α-³²P]ATP (111 TBq/mmol) oder 110 μM (37MBq) [2,5',8-³H]ATP (1.67 TBq/mmol) verwendet. Die restliche Reaktionsmischung bestand aus 100mM Tris/HCl, pH 8.0, 10mM MgCl₂, 1 mM Na₂SO₄, 25μl anorganischer Pyrophosphatase (500 U/ml als Suspension in [NH₄]₂SO₄) und 40μl APS-Kinase Lösung (40mM Tris/HCl pH 8.0, 0.2U, 12μg Protein). Die Reaktion wurde durch Zufügung von 5μl ATP-Sulfurylase (Lyophilisat mit Zitratpuffersalzen, rekonstituiert in H₂O, 10U/ml) gestartet. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 200μl. Die Reaktionsdauer war 4 - 5 Stunden, die Temperatur war 30°C. Die Produkte wurden durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) aufgereinigt. Die durchschnittliche Ausbeute an [5'-³²P]PAPS und [2,5',8-³H]PAPS belief sich auf 25-35% mit einer spezifischen Aktivität von 3.7TBq/mmol für [5'-³²P]PAPS und 1.67TBq/mmol für [2,5',8-³H]PAPS.

3.2.3. Synthese von [³⁵S]PAPS

[³⁵S]PAPS wurde durch Inkubation von ATP und Sulfat in der Gegenwart von ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und anorganischer Pyrophosphatase hergestellt.

ATP-Sulfurylase und Pyrophosphatase wurden vor der Reaktion durch Chromatographie auf einer Sephadex G-25-Säule (Säulenvolumen $\sim 750\mu\text{l}$), die durch Zentrifugation bei 1000rpm (Sorvall RT 6000, Rotor H1000B) 10 Minuten lang gepackt worden war, entsalzt. Dazu wurden Pyrophosphatase (500 U/ml) und ATP-Sulfurylase (10 U/ml) in einem Verhältnis von 2:1 gemischt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde durch Zentrifugation bei 1000rpm (Sorvall RT 6000, Rotor: H 1000 B) 10 Minuten lang eluiert. Die Reaktionsmischung bestand aus 100mM Tris/HCl, pH-8.0, 10mM MgCl_2 , 5mM MgATP (aus einer vorgemischten Lösung bestehend aus 50mM Na_2ATP , 50mM MgCl_2 , 150mM Tris als freie Base), 925MBq [^{35}S]SO₄ (55 TBq/mmol, trägerfrei), 15 μl der entsalzten Mischung aus Pyrophosphatase und ATP-Sulfurylase und 40 μl APS-Kinase Lösung (40mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.2U, 12 μg Protein). Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 200 μl . Die Reaktionsdauer war 4 - 5 Stunden, die Temperatur war 30°C. Die Produkte wurden durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) aufgereinigt. Die Ausbeute an [^{35}S]PAPS betrug mehr als 70%, die spezifische Aktivität betrug $\sim 37\text{TBq/mmol}$.

3.2.4. Konversion von [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS zu [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAP

Ein Aliquot von [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS wurde bis zur Trockene lyophilisiert. Der Rückstand wurde in demselben Volumen an 0.1N HCl aufgenommen und 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mit 1N NaOH neutralisiert. Die Konversion von PAPS zu PAP wurde durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) kontrolliert. Danach wurde das Reaktionsprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet.

3.2.5. Konversion von [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS zu [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]APS

100 μl [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS wurden bis zur Trockene lyophilisiert. Der Rückstand wurde in demselben Volumen Wasser aufgenommen und mit 10 μl Nuclease P1 versetzt (1000U/ml in 30mM Essigsäure/Natriumacetat, pH 5.3). Die Lösung wurde 2 Stunden lang bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 1 Minute in kochendem Wasser erhitzt, um das Enzym zu deaktivieren. Die Konversion von [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS zu [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]APS wurde durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) überprüft. Danach wurde das Reaktionsprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet.

3.2.6. Analytische und präparative Aufreinigung von PAPS

PAPS wurde durch Dünnschichtelektrophorese auf Zelluloseplatten (Schleicher und Schüll (Dassel), F1440, 20 x 20cm) aufgereinigt. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 5% Essigsäure, 0.5% Pyridin und 94.5% H₂O mit einem pH von 3.5. Die Elektrophorese wurde eine Stunde lang mit 500V Spannung entwickelt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Platten mit einem Fön vorsichtig getrocknet. Anschließend wurden die Platten autoradiographiert ([3'-³²P]PAPS, [5'-³²P]PAPS: Fujii, NIF New RX-100-Film, [³⁵S]PAPS, [2,5',8-³H]PAPS: Kodak, X-OmatTM AR5-Film). Die Autoradiogramme wurden benutzt, um PAPS auf den Platten zu lokalisieren. Die Zellulose der PAPS enthaltenden Region wurde von der Platte gekratzt und in 10ml 50mM Triethylammoniumhydrogenkarbonat (pH 7.0) suspendiert. Die Zellulose wurde durch Zentrifugation (10 Minuten bei 3000rpm und 4°C, Zentrifuge: Hereaus Christ, 4400; Rotor: 2150) entfernt. Das resultierende Sediment wurde zweimal mit demselben Volumen an Puffer gewaschen. Die resultierenden Überstände wurden vereinigt und anschließend lyophilisiert, bis ein Volumen von ungefähr 3-5ml erreicht war. Die Ausbeute an Produkt wurde durch Flüssigszintillationszählung einer kleinen Probe der Lösung ermittelt. Die Konzentration des Produktes wurde aus der bekannten spezifischen Aktivität berechnet. Vor der Verwendung wurde der Puffer durch Lyophilisation bis zur Trockene entfernt. Der Rückstand wurde in einem geeigneten Puffer aufgenommen.

3.3. Proteinanalytische Methoden

3.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde entweder mit einem Coomassie-Blau Bindungsassay nachgewiesen (Bradford, 1976), wobei die Lösungen fertig gekauft wurden (Biorad, München), oder durch eine modifizierte Lowry-Methode (Peterson, 1977) bestimmt. In beiden Fällen wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet.

3.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen analysiert (Laemmli et al., 1970). Die Abmessungen der Gele war entweder 0.2cm Dicke, 18.5cm Länge und 18.5cm Breite oder 0.1cm Dicke, 9 cm Länge, und 10cm Breite (Minigel). Die Proteine wurden in SDS-Probenpuffer gelöst (Endkonzentrationen: 125mM-Tris/HCL pH 6.8,

3%(w/v)SDS, 10%(v/v)Glycerin, 3.3% 2-Mercaptoethanol und eine Spur Bromphenolblau). Als Molekulargewichtsstandards wurde eine fertige Mischung aus Myosin (205kDa), Phosphorylase b (97kDa), Rinderserumalbumin (67kDa), Ovalbumin (43kDa), Carboanhydrase (30kDa), Trypsininhibitor (20kDa) und α -Lactalbumin (14 kDa) verwendet (Pharmacia, Freiburg). Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 0.1% (w/v) Coomassie Blau R, Methanol: Essigsäure: Wasser (5:1:4) gefärbt, in 2-Propanol: Essigsäure: Wasser (1:1:8) entfärbt, gewässert und getrocknet (Lee und Huttner, 1983). Radioaktiv markierte Banden wurden durch Autoradiographie oder Fluorographie sichtbar gemacht (Kodak, X-Omat™ AR5-Film). Für die Fluorographie wurden die Gele, zur Verstärkung der Strahlung von [³⁵S]Schwefel und [³H]Tritium, in 1M Natriumsalicylat getränkt. Zur Quantifizierung von radioaktiv markierten Proteinbanden wurden diese unter Verwendung der Autoradiogramme lokalisiert und ausgeschnitten. Anschließend wurde die Radioaktivität der Proteinbanden durch Flüssigszintillationszählung in einem Szintillationscocktail quantifiziert.

3.3.3. Zweidimensionale Elektrophorese (isoelektrische Fokussierung/Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die zweidimensionale Elektrophorese wurde durchgeführt mit isoelektrischer Fokussierung als erster Dimension und SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese als zweiter Dimension (O'Farrell, 1975). Für die isoelektrische Fokussierung wurden in Endkonzentrationen 1%(w/v) Ampholyte, mit einem pH Bereich von 3.5 - 9.5 und 1%(w/v) Ampholyte mit einem pH Bereich von 5 - 7, verwendet. Die Proben enthielten bis zu 0.5% SDS (Endkonzentration) (O'Farrell, 1977).

3.3.4. Proteintransfer auf Nitrozellulosefilter

Der Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosefilter wurde, im wesentlichen, nach der Methode von Vaessen et al., 1981, durchgeführt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel sofort auf ein in Transferpuffer angefeuchtetes Blatt Nitrozellulose gelegt. Der Transferpuffer bestand aus, in Endkonzentrationen, 192mM Glycin, 25mM Tris, pH 8.3, 0.5%SDS, 20% Methanol. Der Proteintransfer wurde senkrecht in Kammern mit Teflon-Kohleelektroden durchgeführt. Dazu wurde 3 Stunden lang eine konstante Spannung von 40V angelegt. Die Kammer wurde durch fließendes Wasser gekühlt. Nach dem Transfer wurden die Filter an der Luft getrocknet. Wenn nötig wurden die Filter vor dem Trocknen mit Ponceau-S Lösung (in 3%Trichloressigsäure) gefärbt. Nach der Trocknung wurden sie autoradiographiert.

3.3.5. Elektroelution

p85 wurde in verschiedenen Fraktionen der Rindernebenniere durch Inkubation mit [$3'$ - 32 P]PAPS radioaktiv markiert (s. 3.5.). Danach wurden die Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde unfixiert getrocknet und anschließend autoradiographiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Autoradiogrammes radioaktiv markiertes p85 im Gel lokalisiert, ausgeschnitten und der Gelstreifen in eine Elektroelutionskammer (Biotrap, Schleicher und Schüll (Dassel)) gelegt. Diese Kammer kann maximal zwei feuchte Gelstreifen mit den Abmessungen 0.6x1x15cm aufnehmen. Die Elektroelutionskammer wurde in eine Flachbettgelelektrophoreseapparatur montiert und das System mit maximal 1.5l Elutionspuffer gefüllt. Der verwendete Elutionspuffer setzte sich aus 12.5mM N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin/Tris, pH 8.6 und 0.05% SDS (Endkonzentrationen) zusammen. Unmittelbar danach wurde eine Spannung von 150V angelegt. Die Elektroelution wurde mindestens 12 Stunden lang mit 150V konstanter Spannung bei 4°C durchgeführt. Vor der Entnahme des Eluates wurde die Spannung 10 Sekunden lang umgepolt, um Proteine, die an den Membranen der Elutionskammer hafteten, abzulösen. Danach wurde die Probe aus der Elutionskammer entnommen. Ein Ausspülen der Elutionskammer mit Elutionspuffer wurde in der Regel nicht durchgeführt, um das Volumen des Eluates so klein wie möglich zu halten. Das Volumen des Eluates war 200 - 500µl.

3.3.6. Limitierte Proteolyse von radioaktiv markierten Proteinen

Die Prozedur wurde nach einer veröffentlichten Vorschrift durchgeführt (Lee et al., 1977). Radioaktiv markierte Proteinbanden wurden aus Gelen geschnitten und die Gelstücke in die Taschen eines SDS-Gels gesteckt. Anschließend wurden die radioaktiven Gelstücke mit 0.5µg V8-Protease in SDS-Probenpuffer 125mM Tris/HCl, pH 6.8, 3% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin (Endkonzentrationen) überschichtet. Es wurden 40V konstante Spannung angelegt, bis die Front der Proteine durch Bromphenolblau sichtbar gemacht das Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung nach Belieben gewählt. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel durch Autoradiographie analysiert.

3.3.7. Tryptischer-chymotryptischer Verdau von radioaktiv markiertem p85

Gelstücke, die radioaktiv markiertes p85 enthielten, wurden in 2ml 50mM NH_4HCO_3 (Endkonzentration) in der Gegenwart von 100 μg Trypsin 12 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden noch einmal 100 μg Trypsin in 100 μl 50mM NH_4HCO_3 (Endkonzentration) zugesetzt und die Inkubation 12 Stunden lang fortgesetzt. Danach wurden 100 μg Chymotrypsin in 100 μl 50mM NH_4HCO_3 (Endkonzentration) zugegeben und die Inkubation 12 Stunden lang fortgesetzt. Abschließend wurde NH_4HCO_3 durch erschöpfende Lyophilisation entfernt. Der Rückstand wurde in 10 μl Elektrophoresepuffer (pH 1.9) aufgenommen. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 2.2 % HCOOH , 7.8% CH_3COOH , 90% H_2O . Die Proben wurden durch Dünnschichtelektrophorese in der ersten Dimension (pH 1.9) und durch aufsteigende Dünnschichtchromatographie in der zweiten Dimension aufgetrennt. Der Puffer, der für die Dünnschichtchromatographie verwendet wurde, bestand aus 37.5% 1-Butanol, 25% Pyridin, 7.5% Essigsäure, 30% Wasser. Die Proben wurden für die erste Dimension in der Mitte der Platte aufgetragen mit einem Abstand von 3.5 cm von dem Rand der Dünnschichtplatte, der in der zweiten Dimension der untere Rand der Platte sein würde. Die erste Dimension wurde 70 Minuten lang bei 750V entwickelt. Die zweite Dimension wurde entwickelt, bis die Lauffront 1- 2 cm von dem oberen Rand der Platte entfernt war. Nach dem Trocknen wurde die Platte durch Autoradiographie analysiert.

3.3.8. Phosphoamino säureanalyse

Die Methode ist detailliert beschrieben (Lee und Huttner, 1983). Gelstücke, die radioaktiv markierte Proteine enthielten, wurden in 1ml 50mM NH_4HCO_3 (Endkonzentration) in der Gegenwart von 100 μg Trypsin 19 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden noch einmal 100 μg Trypsin in 100 μl 50mM NH_4HCO_3 (Endkonzentration) zugesetzt und die Inkubation 5 Stunden lang fortgesetzt. NH_4HCO_3 wurde durch erschöpfende Lyophilisation entfernt. Der Rückstand wurde in 1ml 6N HCl aufgenommen und 2 Stunden lang bei 110°C unter Luftausschluß inkubiert. Danach wurde die Salzsäure im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in 10 μl Elektrophoresepuffer (pH 1.9, siehe unten) aufgenommen. Die Peptide wurden durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese auf Zelluloseplatten (Schleicher und Schüll (Dassel), F1440, 20 x 20cm) analysiert. Der Elektrophoresepuffer der 1. Dimension bestand aus 2.2 % HCOOH , 7.8% CH_3COOH , 90% H_2O (pH 1.9), der Elektrophoresepuffer der 2. Dimension aus 5% Essigsäure, 0.5% Pyridin, 94.5% Wasser (pH 3.5). Die 1. Dimension wurde bei 750V Spannung 90 Minuten lang entwickelt, die 2. Dimension wurde bei 500V Spannung für 45 Minuten

entwickelt. Radioaktive Peptide wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht, nicht radioaktive Peptide wurden durch ansprühen, mit 1% (w/v) Ninhydrin in Aceton gefärbt. Die Färbung wurde durch Erwärmen auf 110°C sichtbar gemacht.

3.3.9. Verdau von Glykoproteinen mit Neuraminidase

30µl der 0.5/1.5M-Interphase (~60µg Protein, siehe 3.4.2.) wurden in einem Puffer, bestehend aus 50mM Essigsäure/Natriumacetat (pH 5.4), 1% Triton X-100, 4% Aprotinin, 4µM PMSF in Ethanol (Endkonzentrationen), in der An- oder Abwesenheit von 0.25U Neuraminidase 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Das Endvolumen der Reaktionsmischung betrug 50µl. Nach 2 Stunden wurde die Reaktion mit Eis gekühlt und anschließend mit [3'-³²P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.). Abschließend wurden die Proben durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie des Geles analysiert.

3.3.10. Behandlung von Proteinen mit NH₂OH

Die Methode ist detailliert beschrieben (Hokin et al., 1965).

20µl der 0.5/1.5M-Interphase (~40µg Protein, siehe 3.4.2.) wurden entweder während der Inkubation mit [3'-³²P]PAPS oder nach Beendigung der Reaktion durch TCA-Präzipitation und Resuspendieren des Sedimentes in 1% SDS mit NH₂OH behandelt. Dazu wurde NH₂OH unmittelbar vor der Reaktion durch Mischen von 2 Teilen 8N NaOH mit 5 Teilen 4N Hydroxylaminhydrochlorid dargestellt. Die Inkubation wurde in einem Puffer aus 100mM Essigsäure/Natriumacetat, (pH 5.4) und 0.8M NH₂OH (Endkonzentrationen) durchgeführt. In den Kontrollproben wurde NH₂OH durch 0.64M NaCl (Endkonzentration) ersetzt.

3.4. Fraktionierung von Geweben und Zelllinien

3.4.1. Präparation des 100K-Sedimentes aus Geweben und Zelllinien

Die Fraktionen wurden aus verschiedenen Geweben und Zelllinien präpariert. Dabei wurden alle Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt. Die Gewebe wurden in kleine Stücke geschnitten und mit 0.3M Saccharose versetzt (10faches Volumen/Gewicht). Anschließend wurden sie mit einem durch einen Motor angetriebenen Glas-Teflon Homogenisator homogenisiert (5-10mal, 1000

rpm). Die Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation bei 1000g (Zentrifuge: Hereaus Christ, 4400, Rotor 2150)sedimentiert. Die Sedimente wurden in 10ml 10mM Tris/HCl, pH 7.4 und 10mM EDTA aufgenommen und mit Ultraschall behandelt (Branson sonifier, 3 x 15 Sekunden, volle Leistung). Die Homogenate der Gewebe und Zellen wurden in einem SS34 Rotor bei 800g (Sorvall) 10 Minuten lang zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden in einem Ti 70.1 Rotor (Beckman) 30 Minuten lang bei 100,000g zentrifugiert. Die resultierenden Sedimente wurden in 0.3M Saccharose resuspendiert und in kleinen Portionen bei -20°C oder -70°C gelagert.

3.4.2. Präparation des 20K-Sedimentes und der 0.5/1.5M-Interphase

Die Fraktionen wurden aus Rindernebennieren präpariert. Alle Zentrifugationen wurden bei 4°C durchgeführt. Die Nebennieren wurden von Fett befreit, bevor sie in kleine Stücke geschnitten wurden. Die Stücke wurden mit 0.3M Saccharose versetzt (4faches Volumen/Gewicht) und mit einem durch einen Motor angetriebenen Glas-Teflon Homogenisator homogenisiert (3mal, 2750 rpm). Das Homogenat wurde in einem GSA-Rotor (Sorvall) bei 800g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden anschließend in einem GSA-Rotor(Sorvall) bei 20,000g für 30 Minuten zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden verworfen und die Sedimente wurden entweder in 0.3 M Saccharose aufgenommen (20K-Sediment) und in kleinen Portionen bei -70°C gelagert oder weiter fraktioniert. Dazu wurde das 20K-Sediment in 0.5 M Saccharose aufgenommen, wobei das Volumen halb so groß war wie das Volumen vor der Zentrifugation bei 20,000g. Anschließend wurde die Lösung über das gleiche Volumen von 1.5M Saccharose geschichtet. Der resultierende Zweistufengradient wurde anschließend in einem GSA-Rotors (Sorvall) bei 20,000g 45 Minuten lang zentrifugiert. Das Material an der Phasengrenze zwischen 0.5M und 1.5M Saccharose wurde gesammelt (0.5/1.5 Interphase). Die Proteinkonzentration von ~6 mg/ml wurde durch Verdünnung mit Wasser auf 1.9mg/ml eingestellt. Das Material wurde in kleinen Portionen bei -70°C gelagert. Der Rest des Gradienten wurde verworfen.

3.4.3. Subzelluläre Fraktionierung des Rindernebennierenmarkes

Die subzelluläre Fraktionierung des Rindernebennierenmarkes wurde vorgenommen wie von Trifaro und Duerr (1976) beschrieben .

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Aus Rindernebennieren wurde das Mark präpariert, in kleine Stücke zerschnitten, in 0.3M Saccharose aufgenommen (4faches

Volumen/Gewicht) und mit einem durch einen Motor angetriebenen Glas-Teflon Homogenisator homogenisiert (3mal, 2750 rpm). Das Homogenat wurde in einem SS34 Rotor (Sorvall) bei 800g 10 Minuten lang zentrifugiert, der resultierende Überstand wurde anschließend in einem SS34 Rotor (Sorvall) bei 20,000g 20 Minuten lang zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde in 0.3M Saccharose aufgenommen (1ml pro 2.5g Frischgewicht des Nebennierenmarkes). 4ml dieser Lösung wurden über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten mit 0.8M (5ml), 1.0M (6ml), 1.2M (6ml), 1.4M (6ml), und 1.6M (10ml) Saccharose geschichtet. Der Gradient wurde in einem SW28 Rotor (Beckman) bei 113,000g 70 Minuten lang zentrifugiert. Proben wurden von den verschiedenen Phasengrenzen, der obersten Stufe und dem Sediment, welches in 0.3M Saccharose resuspendiert wurde, entnommen. Die Proben wurden in kleinen Portionen bei -20°C gelagert.

3.4.4. Subzelluläre Fraktionierung der Rattenleber

Die subzelluläre Fraktionierung von Rattenleber wurde vorgenommen wie von Sztul et al beschrieben (1983).

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C vorgenommen. Die Leber wurde in kleine Stücke geschnitten, in 0.25M Saccharose aufgenommen (5faches Volumen/Gewicht) und mit einem durch einen Motor angetriebenen Glas-Teflon Homogenisator homogenisiert (6-8mal, 2850 rpm). Das Homogenat wurde in einem Ti 60 Rotor (Beckman) bei 10,000g 10 Minuten lang, der resultierende Überstand wurde anschließend in dem selben Rotor bei 105,000g 90 Minuten lang zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde mit Hilfe des Glas-Teflon-Homogenisator (3-5mal, 2850rpm) in 0.25M Saccharose resuspendiert. Die Suspension wurde durch Zufügung von 2M Saccharose auf eine Konzentration von 1.22M Saccharose eingestellt. (Kontrolle durch Refraktionsindex: $1.22M = 1.3920$). Das Volumen der Lösung betrug 1ml pro 1.5g Frischgewicht der Leber. 10ml dieser Lösung wurden mit 1.15M (8ml), 0.86 (8ml) und 0.25M (8ml) Saccharose überschichtet. Der Gradient wurde in einem SW27 Rotor (Beckman) 180 Minuten lang bei 82,500g zentrifugiert. Material wurde von der 0.25/0.86M Phasengrenze, der 0.86/1.15M Phasengrenze, der 1.15M Phase, der 1.22M Phase und dem in 0.25M Saccharose resuspendierten Sediment entnommen.

3.4.5. Natriumkarbonatbehandlung und Triton X-114 Kondensation

Die Prozedur ist eine Kombination der Natriumkarbonatbehandlung (Fujiki et al., 1982) und der Triton X-114-Kondensation (Bordier, 1981).

Wenn nicht anderes angezeigt, wurden alle Zentrifugationen bei 4^o C durchgeführt. Ein 20K-Sediment (siehe 3.4.2.) wurde durch Verdünnung mit 0.3M Saccharose auf eine Proteinkonzentration von 500µg/ml eingestellt. Die Membranen wurden durch Zentrifugation in einem Ti70.1 Rotor (Beckman) bei 100,000g 30 Minuten lang sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in demselben Volumen an 0.5M NaCl aufgenommen und bei 100,000g 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in demselben Volumen an 0.1M Na₂CO₃ resuspendiert, 30 Minuten lang bei 4^oC inkubiert und dann bei 100,000g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Aliquot verworfen. Der pH-Wert dieser Probe wurde mit 1N HCl auf 7 eingestellt. Das Sediment wurde 3mal mit eiskaltem Wasser gewaschen und in einem Puffer bestehend aus, in Endkonzentrationen, 10mM Tris/HCl, pH 7.4, 150mM NaCl und 1%Triton X-114 resuspendiert. Das Volumen war so groß wie das Volumen der ursprünglichen Na₂CO₃-Lösung. Wenn nötig wurde der pH-Wert der Lösung mit 1N HCl auf 7 justiert. Die Suspension wurde bei 100,000g für 30 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10ml Tris/HCl, pH 7.4, 0.1%SDS (Endkonzentrationen) resuspendiert, ein Aliquot wurde aufgehoben, der Rest wurde verworfen. Der Überstand wurde über ein Saccharosekissen bestehend aus 10mM Tris/HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.6% Saccharose und 0.06% Triton X-114 geschichtet. Die Lösung wurde für 3 Minuten bei 30^o C inkubiert und anschließend für 10min in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 23^oC zentrifugiert. Ein Aliquot der wäßrigen Phase wurde aufgehoben, der Rest verworfen. Die mit Detergenz angereicherte Phase wurde durch Zugabe eines Puffers bestehend aus, in Endkonzentrationen, 10mM Tris/HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, und 2mM EDTA auf das Volumen der Triton X-114 Lösung vor der Kondensation gebracht. Alternativ wurde die Detergenzphase durch Aceton-Präzipitation bei -20^oC weiter konzentriert. Dazu wurde soviel Aceton direkt zu der Detergenzphase gegeben, das die Endkonzentration an Aceton 80% betrug. Nach der Inkubation der Proben bei -20^oC über Nacht, wurde das Präzipitat durch Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge sedimentiert. Das resultierende Sediment wurde in 1 - 2ml eines Puffers bestehend aus 10mM Tris/HCl, pH 7.4, 150mM NaCl und 1% Triton X-114 (Endkonzentrationen) aufgenommen.

3.4.6. Immunisolierung von p85-haltigen Membranen aus Fraktionen der Rattenleber

Als Immunadsorbens wurden Kügelchen verwendet, an die ein IgG-Antikörper gegen den FC-Teil von Mausantikörpern kovalent gebunden war. Diese Kügelchen wurden mit einem monoklonalen IgG-Mausantikörper gegen den zytoplasmatischen Teil des polymeren IgA-Rezeptors inkubiert. Die Inkubation wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt (Howell und Ansorge, 1988). Als Kontrolle wurden Kügelchen verwendet, an die Rinderserumalbumin kovalent gebunden war. Für die Immunisolierung von p85 aus Rattenleber wurden die beiden Fraktionen der subzellulären Fraktionierung (siehe 3.4.4.) mit der höchsten Galaktosyltransferaseaktivität 0.25/0.86M Interphase und 0.86/1.15M Interphase verwendet. Diese wurden für 2 Stunden bei 4°C mit Kügelchen inkubiert, die entweder einen spezifischen IgG-Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil des polymeren IgA Rezeptors oder Rinderserumalbumin trugen. Nach der Inkubation wurden die Kügelchen durch Zentrifugation abgetrennt. Der resultierende Überstand wurde mit Triton X-114 versetzt. Das resultierende Sediment wurde in dem selben Volumen eines Triton X-114-haltigen Puffers gelöst und danach die Kügelchen durch erneute Zentrifugation abgetrennt. Die Endkonzentration an Triton X-114 betrug in beiden Fällen 1%. Die Triton X-114 haltigen Lösungen wurden durch Triton X-114 Kondensation weiter fraktioniert. Die resultierenden wässrigen Phasen wurden verworfen, die entsprechenden Detergenzphasen für die Inkubation mit [3'-³²P]PAPS aufgehoben. Gleiche Volumina der resultierenden Detergenzphasen wurden mit [3'-³²P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.). Abweichend vom Standardassay wurden die Proben bei einem pH-Wert von 4.0 inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert.

3.5. Markierung von p85 (Standardassay)

Die Reaktionsmischung bestand aus 30µl Probe (10-60µg Protein), 50mM MOPS (pH 7.0), 10mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 1.3 mM NaF, 1µM [3'-³²P]PAPS (3.7 oder 7.4TBq/mmol) (Endkonzentrationen). Detergenzien und zusätzliche Reagenzien wurden, wenn nötig, 10-fach konzentriert zugegeben, das Probenvolumen wurde dann auf 25µl reduziert. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 50µl. Die Proben wurden 1 Minute lang auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde entweder durch Zufügen von 5fach konzentriertem SDS-Probenpuffer und Erhitzen in kochendem Wasser oder durch Präzipitation mit 500µl 10% eiskalter Trichloressigsäure (TCA) beendet. Frühestens 30 Minuten nach Zugabe der TCA wurden die Proben in einer Tischzentrifuge 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, das resultierende Sediment wurde in 500µl Aceton (-20°C) resuspendiert und erneut für 10 Minuten zentrifugiert.

Das resultierende Sediment wurde in SDS-Probenpuffer (125mM Tris/HCL, pH 6.8, 3%(w/v)SDS, 10%(v/v) Glycerin, 3.3% 2-Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Reaktion von Proben, die bereits vor der Beendigung der Reaktion SDS enthielten, wurde ausschließlich durch Erhitzen in kochendem Wasser beendet. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und anschließende Autoradiographie des Geles analysiert. Wenn nötig wurden die radioaktive Banden durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert.

3.5.1. Bestimmung des Zeitverlaufes der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktion

Für die Bestimmung des Zeitverlaufes der Phosphorylierung und Dephosphorylierungsreaktion wurde der Standardassay (3.5.) modifiziert. Das Reaktionsvolumen wurde entweder auf 20µl reduziert oder auf 100µl erhöht. Die Konzentrationen des Puffer, der Salze und des [3^{32} P]PAPS wurde nicht verändert. Die Reaktion wurde für einen Zeitraum von 0 - 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Pipettieren der Reaktionslösung in heißen SDS-Probenpuffer (125mM-Tris/HCL (pH 6.8), 3%(w/v) SDS, 10%(v/v) Glycerin, 3.3% 2-Mercaptoethanol), der durch kochendes Wasser erhitzt worden war, beendet. Das Volumen des SDS-Probenpuffers war entweder 480µl oder 400µl, das Endvolumen nach Zupipettieren der Reaktionslösung betrug 500µl. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese, mit anschließender Autoradiographie des Geles, analysiert. Wenn nötig, wurden die radioaktive Banden durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert.

3.5.2. Markierung von p85 in Gelstücken und Analyse der Nukleotide in der Reaktionsmischung

60µg der 0.5/1.5M-Interphase wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden Minigele verwendet, die Länge des Sammelgeles betrug 1 - 2 cm. Die Elektrophorese wurde bei 40V konstanter Spannung für 90 - 180 Minuten entwickelt. Danach wurden Streifen an jeder Seite des Gels, die Molekulargewichtsstandards enthielten, abgeschnitten und fünf Minuten lang mit 0.3M CuCl₂ gefärbt. Mit Hilfe dieser gefärbten Streifen wurde die 67 - 94kDa Region des restlichen Geles lokalisiert und ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in 70µl Wasser gelegt und 30µl SDS-Probenpuffer (125mM-Tris/HCL (pH 6.8), 3%(w/v)SDS, 10%(v/v)Glycerin, 3.3% 2-Mercaptoethanol) dazu gegeben. Anschließend wurden Puffer, Salze und [3^{32} P]PAPS in denselben Konzentration wie für den Standardassay zugegeben. Das Endvolumen des Reaktionsansatz betrug 150µl. Die Reaktion wurde 5 Minuten lang bei

Raumtemperatur durchgeführt und dann durch Erhitzen in kochendem Wasser beendet. Danach wurden die Proben inklusive Gelstück durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Alternativ wurde die Reaktion für einen Zeitraum von 0 - 60 Minuten durchgeführt. Nach 15 und 60 Minuten wurde ein Aliquot von 10µl entnommen in 200µl eiskalte 10%ige Trichloressigsäure (TCA) pipettiert und gemischt. Dann wurden 200µl einer Mischung aus Trichlortrifluorethan und Trioctylamin (3:2) zugegeben, um die TCA zu extrahieren (Fleischer et al, 1981). Die Probe wurde kräftig gemischt und anschließend für 5 Minuten in einer Eppendorfschleuder bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und erneut mit 200µl Trichlortrifluorethan/Trioctylamin (3:2) extrahiert, wie beschrieben. Ein Aliquot von 2µl der resultierenden wässrigen Phase wurde dann durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) analysiert.

3.5.3. Photoaffinitätsmarkierung

Die Markierungsreaktion wurde in Mikrotitergefäßen (Dynatech) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen des Standardassays wurden übernommen und modifiziert. Die Reaktionslösung (Protein, Puffer, PAPS) wurde für 30 Minuten, auf Eis, mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254nm (Deluxe, UV-Lampe 29000, CAMAG, West-Berlin) bestrahlt. Die Distanz zwischen UV-Lampe und Proben betrug 1.5cm - 2.5cm. Die Kontrollproben befanden sich ebenfalls in Mikrotitergefäßen auf derselben Platte. Sie wurden gegen UV-Strahlung durch Abdeckung mit Aluminiumfolie geschützt. Die Reaktion wurde wie für den Standardassay beschrieben beendet. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie des Geles analysiert. Wenn nötig, wurden radioaktive Banden durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert.

3.6. Enzymassays

3.6.1. Tyrosylprotein-Sulfotransferase-Assay

Die Aktivität der Tyrosylprotein-Sulfotransferase wurde durch einen kürzlich entwickelten Peptidassay nachgewiesen (Niehrs und Huttner, unveröffentlichte Ergebnisse). Der Assay mißt den Transfer von [³⁵S]Sulfat auf Tyrosin im C-terminalen Ende von pro-Cholecystokinin. Als Peptid wurde eine Modifikation des C-terminalen Endes von pro-Cholecystokinin mit zwei zusätzlichen Lysinen verwendet. Die Reaktionsmischung bestand aus 35µl Probe (10-50µg Protein), 100µM Peptid, 50mM Mes (pH 6.5), 5mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 5mM 2-Mercaptoethanol,

1mM NaF, 1% Triton X-100 und 5 μ M [35 S]PAPS (3.7TBq/mmol) (Endkonzentrationen). Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 50 μ l. Kontrollproben wurden Wasser an Stelle des Peptids zugesetzt. Die Reaktion wurde nach 0, 10, 20 Minuten Inkubation bei 30°C durch Erhitzen in kochendem Wasser beendet. Danach wurden 2.5 μ l Phenolrot in 0.5M NaCl zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde danach auf ca. 30 μ l eingeeengt und anschließend durch Papierelektrophorese analysiert. Für die Elektrophorese wurde 3MM Whatman-Papier verwendet, das in 30cm lange und 10 cm breite Streifen geschnitten wurde. Die Proben wurden in der Mitte aufgetragen. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 2.2% Ameisensäure, 7.8% Essigsäure und 90% Wasser (Endkonzentrationen). Die Elektrophorese wurde bei 400 V angelegter Spannung für 10 Minuten entwickelt. Das Peptid wanderte unter diesen Bedingungen in die Richtung der Kathode. Nach der Elektrophorese wurde das Papier getrocknet und der zur Kathode gerichtete Teil des Papiers wurde entsprechend der Auftragung der Proben zerschnitten und die in ihm enthaltene Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Die so ermittelten Werte setzen sich aus Produkten endogener Sulfatierung und sulfatiertem Peptid zusammen. Durch Subtraktion der entsprechenden Werte der Kontrollreaktion ohne Peptid, die nur durch Produkte endogener Sulfatierung verursacht werden, kann die Menge an sulfatiertem Peptid bestimmt werden.

3.6.2. Galaktosyltransferase-Assay

Der Assay misst den Transfer des [3 H]Galaktose Restes von UDP-Galaktose auf Asialoagalaktotetuin, das nach der Methode von Kim et al. (1971) hergestellt wurde (Howell und Palade, 1978).

Die Reaktionsmischung bestand aus ~10 μ g Protein, 30mM Natriumkacodylatpuffer pH 6.6, 30mM MnCl₂, 30mM 2-Mercaptoethanol, 0.2% Triton X-100, 2mM ATP, 2mg Asialoagalaktotetuin und 0.39nM [3 H]UDP-Galaktose (in Endkonzentrationen). Das Volumen der Reaktionslösung betrug 100 μ l. Der Assay wurde für einen Zeitraum von 0 - 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 1.0ml eiskalter 1% Phosphowolframatlösung in 0.5N Perchlorsäure gestoppt. Die Mischung wurde in einer Eppendorf Tischzentrifuge sedimentiert. Das resultierende Sediment wurde zweimal mit eiskalter 1% Phosphowolframatlösung in 0.5N Perchlorsäure und einmal mit eiskalter 1% Ethanollösung gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in 1% SDS resuspendiert und die Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION
TEIL 1:
SYNTHESE VON PAPS
MIT VERSCHIEDENEN RADIOAKTIVEN RESTEN

Die Verwendung von PAPS in Photoaffinitätsexperimenten zur Identifizierung von PAPS-bindenden Golgi-Membranproteinen setzte die Lösung von zwei Problemen voraus:

- 1.) Die Synthese von PAPS mit einem anderen radioaktiven Rest als [^{35}S]Sulfat war notwendig.
- 2.) Diese Verbindung mußte eine hohe spezifische Aktivität aufweisen, um wenig abundante Proteine identifizieren zu können.

Deshalb war die Entwicklung einer Synthese notwendig, die radioaktiv markiertes PAPS mit hoher spezifischer Aktivität und in großer Ausbeute lieferte. Der einfachste Syntheseweg für PAPS beruht auf der Verwendung der Sulfat "aktivierenden" Enzyme ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und anorganischer Pyrophosphatase. Die meisten der in der Literatur beschriebenen PAPS-Synthesen verwenden mehr oder weniger grobe Präparationen dieser Enzyme. Dabei ist die Ausbeute an PAPS gering (Mulder, 1981). Dies kann auf PAPS-abbauende Enzyme und auf ATP verbrauchende Nebenreaktionen zurückgeführt werden. Um solche Nebenreaktionen zu vermeiden, erschien es ratsam, die an der Synthese von PAPS beteiligten Enzyme in reiner Form zu verwenden. Reine ATP-Sulfurylase und anorganische Pyrophosphatase konnten gekauft werden. APS-Kinase war zu Beginn dieser Studien (1984) noch nicht käuflich erhältlich. Dieses Enzym wurde großzügigerweise von Dr. I.H. Segel, University of California, Davies, zur Verfügung gestellt, dem es kurz zuvor gelungen war, dieses Enzym zur Homogenität aufzureinigen (Renosto et al, 1984). Inzwischen kann auch APS-Kinase käuflich erworben werden. Unter der Verwendung der reinen Enzyme war es möglich, eine Synthese für PAPS zu entwickeln, die es ermöglichte [$3'$ - ^{32}P]PAPS, [$5'$ - ^{32}P]PAPS, [$2,5',8$ - ^3H]PAPS und [^{35}S]PAPS mit hoher spezifischer Aktivität und in hoher Ausbeute zu synthetisieren.

4.1. Auftrennung und Analyse der Reaktionsprodukte

Zur Analyse des Reaktionsgemisches und zur Auftrennung des synthetisierten PAPS wurde in allen Fällen eine Dünnschichtelektrophorese durchgeführt. Der Elektrophoresepuffer hatte einen pH-Wert von 3.5. Die Elektrophorese dauerte 1 Stunde, und die angelegte Spannung betrug 500V. Um die Trennleistung der verschiedenen Nukleotide und Ionen unter diesen Bedingungen zu dokumentieren und ihre Identifizierung zu erleichtern, wurden R_f -Werte definiert. Dazu wurde der Laufstrecke von Phenolrot willkürlich ein R_f -Wert von 1 zugeordnet. Die R_f -Werte der Nukleotide und Ionen ergaben sich aus der Laufstrecke der betreffenden Verbindung, geteilt durch die Laufstrecke von Phenolrot in demselben Experiment (Abbildung 7, Seite 37). Die R_f -Werte können sich durch die Anwesenheit von Salzen oder die Änderung der angelegten Spannung verändern. Je nach Art der Synthese stellte sich das Problem, radioaktives PAPS entweder von radioaktivem ATP oder radioaktivem Sulfat zu trennen. Wie die R_f -Werte zeigen, kann PAPS (R_f -Wert 1.5) einwandfrei von ATP (R_f -Wert 0.3) und Sulfat (R_f -Wert 3.8) getrennt werden. Das während der Reaktion entstandene radioaktive PAPS wurde durch Autoradiographie auf den Dünnschichtplatten lokalisiert. Nach der Lokalisation von PAPS wurde die Zellulose der Region abgekratzt und mit einem geeigneten Puffer eluiert. Für die Elution kann im Prinzip jeder Puffer verwendet werden, der sich durch Lyophilisation vollständig entfernen läßt. Sogar Wasser kann verwendet werden, jedoch müssen dafür die Platten sehr sorgfältig getrocknet werden, um zu verhindern, daß die Elutionslösung durch Reste des Elektrophoresepuffers zu stark angesäuert wird. Dies ist notwendig, da PAPS säurelabil ist (Robbins und Lipmann, 1957). Der beste Elutionspuffer ist jedoch Triethylammoniumhydrogenkarbonat bei einem pH-Wert von 7.0. Mit diesem Puffer wurde PAPS am effektivsten von der Zellulose gelöst. Außerdem war der Puffer sehr einfach und rückstandsfrei durch Lyophilisation zu entfernen.

4.2. Synthese von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$

Im Gegensatz zu den anderen PAPS-Synthesen wurde für die $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Synthese nur der zweite Schritt der Sulfat-"Aktivierung" eingesetzt, die Phosphorylierung von APS durch APS-Kinase (Lee et al., 1984). Dies war möglich, weil APS gekauft werden konnte.

Nukleotid	R _f -Wert
ATP	0.4
ADP	0.3
3'-AMP	0.4
5'-AMP	0.3
PAP	1.0
Phenolrot	1.0
APS	1.2
PAPS	1.5
ortho-Phosphat	1.8
Sulfat	3.8

Abbildung 7

Mobilität verschiedener Ionen während der Dünnschichtelektrophorese. Um die Mobilität verschiedener Ionen während der Dünnschichtelektrophorese (500 V, pH 3.5, 1 Stunde) zu charakterisieren, wurden R_f-Werte definiert. Hierzu wurde die Mobilität von Phenolrot unter den genannten Bedingungen gleich 1 gesetzt und die Mobilität anderer Ionen auf diesen Wert bezogen.

Die Reaktionsbedingungen der Synthese wurden aus einem analytischen APS-Kinaseassay entwickelt (Renosto et al., 1984). Für die Synthese wurde eine Mischung aus $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und APS in der Gegenwart von APS-Kinase inkubiert. Da APS ein wirksamer Inhibitor der APS-Kinase ist, wurde versucht, die Akkumulation von APS während der Synthese zu verhindern. Deshalb wurde APS nur in Portionen von 1nmol, das war 1/10 der ATP-Konzentration, in Zeitabständen von 3 Minuten zugegeben, bis nach 60 Minuten insgesamt 20nM APS zugesetzt waren. Ammoniumsulfat wurde der Reaktionsmischung zugesetzt, weil es die APS-Kinase stimuliert und sie unempfindlicher gegen die Inhibition durch APS macht (Renosto et al., 1984). Der Ablauf der Reaktion wurde durch Ziehen von Proben und anschließende Analyse durch Dünnschichtelektrophorese verfolgt. Die Konversion von APS in $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ war nach 60 Minuten vollständig (Abbildung 8, Seite 39). $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ wurde durch präparative Dünnschichtelektrophorese aufgereinigt. Das Endprodukt, nach der Aufreinigung, zeigte keine Verunreinigungen (Abbildung 9, Seite 40). Das radioaktive Endprodukt lief in der Dünnschichtelektrophorese gleich schnell wie ein nicht radioaktiver PAPS-Standard. Nach einer dreißigminütigen Inkubation in 0.1N HCl bei 37°C für 30 Minuten entstand eine Verbindung, die mit einem nicht radioaktiven 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat-Standard (PAP) gleich lief. Außerdem entstand durch Behandlung mit Nuclease P1 eine radioaktive Verbindung, die in der Dünnschichtelektrophorese das gleiche Laufverhalten wie Phosphat zeigte (Abbildung 12, Seite 44). Somit wies das Endprodukt alle Eigenschaften auf, die von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ erwartet wurden. Die Ausbeute an gereinigtem Endprodukt war in der Regel größer als 80% mit einer spezifischen Aktivität von entweder 3.7 TBq/mmol oder 7.4 TBq/mmol.

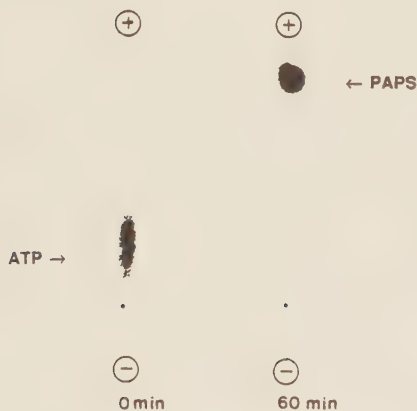
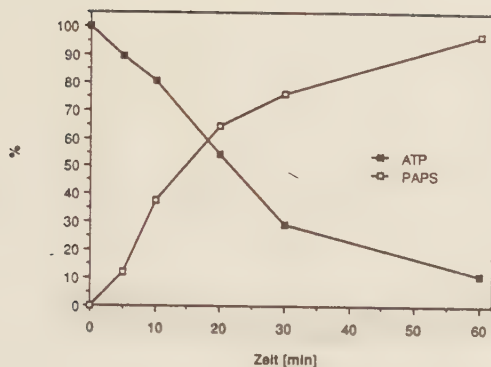


Abbildung 8

Zeitverlauf der $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ Synthese. 10nmol $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (37TBq/mmol) und APS wurden in der Gegenwart von APS-Kinase inkubiert, wobei APS in Zeitabständen von 3 Minuten in Portionen von 1nmol zugegeben wurde. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen, 50fach verdünnt und durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) aufgetrennt. Die radioaktiven Nukleotide $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ wurden durch Autoradiographie auf der Platte lokalisiert, ausgeschnitten und ihre Menge durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Basierend auf diesen Werten entstand der dargestellte Zeitverlauf. Zusätzlich sind die Autoradiogramme für die Zeitpunkte 0 min und 60 min gezeigt. Die Positionen von ATP und PAPS sind durch Pfeile gezeigt. Ihre Positionen wurden durch Berechnung aus den bekannten R_f -Werten ermittelt. Die Auftragungsorte der Proben sind durch die Punkte angedeutet.

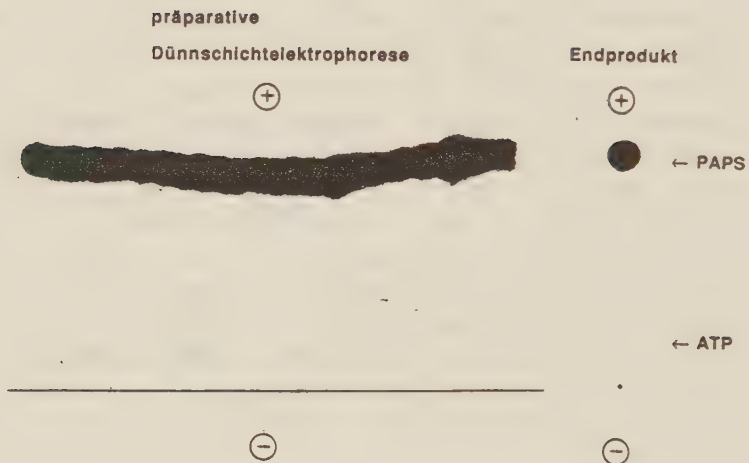


Abbildung 9

Präparative Aufreinigung von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$. Nach Beendigung der $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ Synthese, nach 60 Minuten, wurde das Produkt durch präparative Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) aufgereinigt. Insgesamt wurden 240 μl Reaktionsgemisch auf 4 Platten aufgetrennt. Die Position von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ wurde durch Autoradiographie bestimmt. Ein repräsentatives Autoradiogramm ist gezeigt. Anschließend wurde $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ von den Platten gekratzt, mit 20-30ml Triethylammoniumhydrogenkarbonat von der Zellulose gewaschen und durch Lyophilisation auf ein Volumen von 3-5ml eingengt. Danach wurde das Produkt durch Dünnschichtelektrophorese und anschließende Autoradiographie auf seine Reinheit überprüft. Ein repräsentatives Autoradiogramm ist gezeigt. Die Positionen von ATP und PAPS sind durch Pfeile gezeigt. Ihre Positionen wurden durch Berechnung aus den bekannten R_f -Werten ermittelt. Die Auftragungsorte der Proben sind durch die Linie bzw. den Punkt angedeutet.

4.3. **Synthese von [5'-³²P]PAPS und [2,5',8-³H]PAPS**

[5'-³²P]PAPS und [2,5',8-³H]PAPS konnten nicht wie [3'-³²P]PAPS synthetisiert werden, da das dafür notwendige radioaktive APS weder zu kaufen noch auf einem einfachen Weg zu synthetisieren war. Daher wurden [5'-³²P]PAPS und [2,5',8-³H]PAPS durch Inkubation von entweder [α -³²P]ATP oder [2,5',8-³H]ATP und Sulfat in der Gegenwart der Enzyme ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und anorganische Pyrophosphatase synthetisiert. Dabei wurde ein Überschuß von Sulfat im Vergleich zu ATP eingesetzt. Um die Akkumulation von APS während der Reaktion zu verhindern, war die eingesetzte Aktivität von ATP-Sulfurylase gering im Vergleich zu den eingesetzten Aktivitäten von APS-Kinase und anorganischer Pyrophosphatase. Die Ausbeute dieser Reaktion war theoretisch 50%, weil 2 Mole ATP notwendig sind, um 1 Mol PAPS zu synthetisieren. Die spezifische Aktivität des Endproduktes wurde dadurch nicht beeinflusst, sie war gleich der spezifischen Aktivität des eingesetzten ATP. Die Konversion von [α -³²P]ATP bzw. [2,5',8-³H]ATP zu [5'-³²P]PAPS bzw. zu [2,5',8-³H]PAPS war nach 4 - 5 Stunden Inkubation bei 30°C beendet (Abbildung 10, Seite 42). Die Konversion erreichte die theoretische Grenze (Abbildung 11, Seite 43). Die Ausbeute nach der Aufreinigung war in beiden Fällen größer als 30%. Das Produkt, welches durch die Verwendung von [α -³²P]ATP erhalten wurde, konnte durch Nuclease P1-Behandlung in eine Verbindung überführt werden, welche in der Dünnschichtelektrophorese mit einem APS-Standard gleichlief (Abbildung 12, Seite 44). Somit wies das Produkt die Eigenschaft auf, die man von [5'-³²P]PAPS erwarten würde.

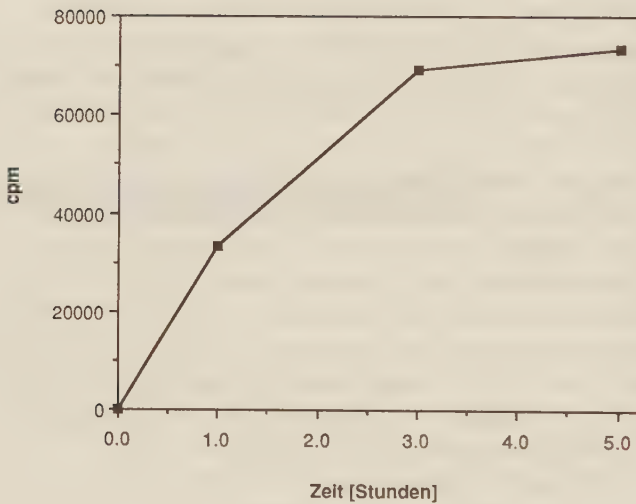


Abbildung 10

Zeitverlauf der Synthese von $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$. $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurde in der Gegenwart von ATP-Sulfonylase, APS-Kinase und anorganischer Pyrophosphatase inkubiert. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen, 50fach verdünnt und durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) aufgetrennt. Die radioaktiven Nukleotide wurden durch Autoradiographie auf der Platte lokalisiert, ausgeschnitten und ihre Menge durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Basierend auf diesen Werten entstand der dargestellte Zeitverlauf.

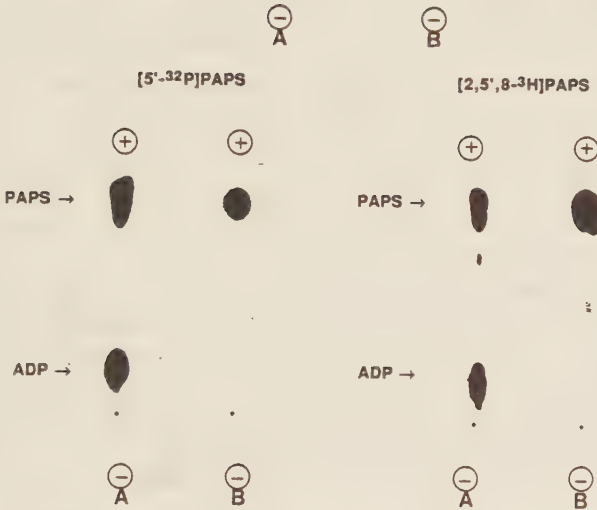


Abbildung 11

Synthese und Aufreinigung von [5'-³²P]PAPS und [2,5',8-³H]PAPS. [α -³²P]ATP oder [2,5',8-³H]ATP wurden in der Gegenwart von ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und anorganischer Pyrophosphatase für 4-5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Konversion von radioaktivem ATP zu PAPS und ADP durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) und Autoradiographie bestimmt. Die entsprechenden Autoradiogramme sind gezeigt (A). Nach der Aufreinigung wurden die Produkte durch Dünnschichtelektrophorese und Autoradiographie auf ihre Reinheit überprüft, die Autoradiogramme sind abgebildet (B). Die Positionen von ADP und PAPS sind durch Pfeile markiert, sie wurden aus den bekannten Rf-Werten berechnet. Die Auftragungsorte der Proben sind durch die Punkte angedeutet.



Abbildung 12

4.4. Synthese von [^{35}S]PAPS

[^{35}S]PAPS wurde auf ähnliche Weise wie [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS und [$2,5',8\text{-}^3\text{H}$]PAPS synthetisiert. Im Gegensatz zu diesen Synthesen befand sich bei der Synthese von [^{35}S]PAPS ATP im 50-fachen Überschuß zu Sulfat und die Pyrophosphatase, die verwendet wurde, war ein Lyophilisat und keine Suspension in Ammoniumsulfat. Da trotzdem nicht ausgeschlossen werden konnte, daß sowohl die Pyrophosphatase als auch die ATP-Sulfurylase durch Sulfat verunreinigt waren, wurden sie durch Ausschlußchromatographie auf einer Sephadex G-25 Säule vor der Reaktion entsalzt. Es wurde vorausgesetzt, daß APS-Kinase frei von Sulfat war, da weder sulfathaltige Puffer noch Ammoniumsulfat-Fällung für ihre Aufreinigung benutzt wurden. Ferner wurde vorausgesetzt, daß keines der Enzyme durch ATP verunreinigt war. Nach 4 - 6 Stunden Inkubation bei 30°C betrug die Konversion von [^{35}S]Sulfat zu [^{35}S]PAPS 90%. Die Verbindung war nach der Aufreinigung frei von Verunreinigungen (Abbildung 13, Seite 46). Die spezifische Aktivität von [^{35}S]PAPS unter diesen Versuchsbedingungen wurde durch die Synthese von [$5'\text{-}^{32}\text{P}$, ^{35}S]PAPS festgestellt. Dabei wurden der Reaktionslösung 9,25 MBq [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP zugesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die spezifische Aktivität errechnet durch die Bestimmung der Inkorporation von [^{35}S]Sulfat und [^{32}P]Phosphat in PAPS. Da die mittlere Energie der β -Strahlung

Abbildung 12

Charakterisierung von [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS und [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS. Um die durch die Synthesen erhaltenen Verbindungen weiter zu charakterisieren, wurden selektiv funktionelle Gruppen abgespalten. Durch Inkubation für 30 Minuten in 0.1N HCl bei 37°C wurde die Phosphosulfatbindung gebrochen, wodurch PAP und freies Sulfat entstand. Die zweistündige Behandlung mit 0.1U Nuclease P1 (37°C , pH = 8) führte zur Abspaltung der $3'$ -Phosphatgruppe am Ribosering. Die Reaktionsprodukte wurden durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) mit anschließender Autoradiographie der Dünnschichtplatten analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet. Das Ausgangsprodukt (A) und das Endprodukt (B) der Reaktion werden miteinander verglichen. Die Positionen von PAP, APS und PAPS sind durch Pfeile gezeigt. Ihre Positionen wurden durch Berechnung aus den bekannten R_f -Werten ermittelt. Die Auftragungsorte der Proben sind durch die Punkte angedeutet.

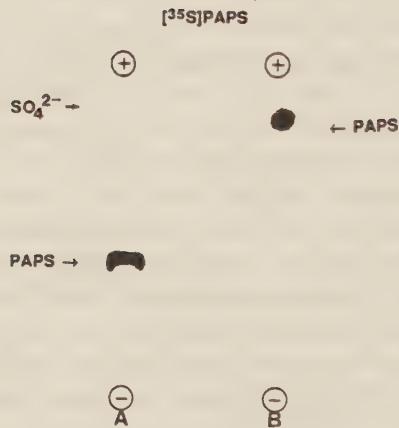


Abbildung 13

Synthese und Aufreinigung von $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$. $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ wurde durch die Inkubation von $[^{35}\text{S}]\text{Sulfat}$ und ATP in der Gegenwart von ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und anorganischer Pyrophosphatase dargestellt. Die Reaktion dauerte 4 - 5 Stunden. Anschließend wurde die Rohausbeute an $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5, 20 Minuten, 500V) und Autoradiographie bestimmt. Ein entsprechendes Autoradiogramm ist abgebildet (A). Nach der Aufreinigung wurde das Produkt $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5, 60 Minuten, 500V) und Autoradiographie auf seine Reinheit überprüft, das Autoradiogramm ist abgebildet (B). Die Positionen von PAPS und Sulfat sind durch Pfeile markiert, sie wurden aus den bekannten Rf-Werten errechnet. Die Auftragungsorte der Proben sind durch die Punkte angedeutet.

von [^{35}S]Schwefel und [^{32}P]Phosphor sehr unterschiedlich ist, können die beiden Isotope durch Flüssigszintillationszählung nach entsprechender Wahl des Energiebereiches zweier Kanäle unterschieden werden. Dabei wurde der Energiebereich des einen Kanals so eingestellt, daß nur von [^{32}P]Phosphor herrührende Strahlung gemessen werden konnte. Der Energiebereich des anderen Kanals wurde so eingestellt, daß im wesentlichen nur die von [^{35}S]Schwefel herrührende Strahlung gemessen werden konnte. Da diese Einstellung jedoch mit dem Energiespektrum von [^{32}P]Phosphor überlappte, mußte der Anteil der von [^{32}P]Phosphor herrührenden Strahlung in diesem Kanal bestimmt werden. Dies geschah durch das Zählen eines reinen [^{32}P]Phosphor-Standards in beiden Kanälen. Da die Zählausbeute von [^{35}S]Schwefel in der Flüssigszintillationszählung unter 100% liegt und abhängig von dem Zustand der Proben ist, wurde die Menge des an PAPS gebundenen [^{35}S]Sulfates aus dem Verhältnis des nicht verbrauchten [^{35}S]Sulfates und des an PAPS gebundenen [^{35}S]Sulfates bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Reaktionslösung durch Dünnschichtelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Mit Hilfe des Autoradiogrammes wurden Sulfat und PAPS auf der Platte lokalisiert, ausgeschnitten und durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert. Die Konzentration von PAPS wurde aus der Menge des gebundenen [^{32}P]Phosphates und der bekannten spezifischen Aktivität von [α - ^{32}P]ATP berechnet. Das Verhältnis von Menge an gebundenem [^{35}S]Sulfat und Konzentration an PAPS ergab dann die spezifische Aktivität von [^{35}S]PAPS. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen lag sie bei 37TBq/mmol.

4.5. Versuch der Synthese von 8-Azido-PAPS

8-Azidoadenin-Verbindungen sind erfolgreich für Photoaffinitätsexperimente verwendet worden (Czarnecki et al., 1979). Daher war es naheliegend, die Möglichkeit zu untersuchen, ob 8-Azido-PAPS bei den Bedingungen, die für die Synthese von [$5'$ - ^{32}P]PAPS verwendet wurden, synthetisierbar ist. Da 8-Azido-APS nicht gekauft werden konnte, schied eine Synthese basierend auf den Bedingungen der [$3'$ - ^{32}P]PAPS Synthese aus. In einem Vorversuch wurde aus Kostengründen 8-Azido-ATP anstelle von 8-Azido- $[\alpha$ - ^{32}P]ATP verwendet. Eine Spur von [^{35}S]Sulfat wurde der Reaktionsmischung zugesetzt, um den Verlauf der Reaktion verfolgen zu können. Nach 1 Stunde Inkubation bei 30°C konnte keine Bildung von 8-Azido- ^{35}S -PAPS beobachtet werden.

dagegen wurde in einer Kontrollreaktion, die unter denselben Bedingungen, nur mit ATP statt mit 8-Azido-ATP, durchgeführt wurde, die Bildung von [^{35}S]PAPS beobachtet (Abbildung 14, Seite 49). Daraus muß geschlossen werden, daß unter den gewählten Bedingungen entweder ATP-Sulfurylase oder APS-Kinase 8-Azidoverbindungen entweder nicht als Substrat akzeptieren oder durch 8-Azidoverbindungen inhibiert werden.

4.6. Diskussion der PAPS-Synthesen

Die Synthese von PAPS mit verschiedenen radioaktiv markierten Gruppen ergab nach der Aufreinigung hohe Ausbeuten. Eine wesentliche Verbesserung der Synthesen, in Hinblick auf Ausbeute, ist nur im Fall der [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS und [$2,5',8\text{-}^3\text{H}$]PAPS Synthese denkbar. Die Ausbeute könnte durch die Verwendung eines ATP-regenerierenden Systems, etwa Kreatinphosphat/Adenylatkinase oder Phosphoenolpyruvat/Pyruvatkinase, gesteigert werden. Die spezifische Aktivität des Produktes würde hierdurch nicht verändert werden.

Hingegen muß die Synthese von 8- N_3 -PAPS auf einem anderen Weg erfolgen. Hierbei wäre an die Einführung der Azidogruppe nach der erfolgten Synthese des radioaktiv markiertem PAPS zu denken, wie es für ATP beschrieben wurde (Czarnecki et al., 1979).

Wesentlich verbessert werden kann die Aufreinigung der Reaktionsprodukte. Die bisher verwendete Dünnschichtelektrophorese auf Zelluloseplatten bei pH 3.5 hat unbestreitbare Vorteile:

- 1.) Die Trennleistung im Hinblick auf ATP und Sulfat ist hoch.
- 2.) Die Reproduzierbarkeit ist groß.
- 3.) Die Trennung ist technisch mit einfachen Mitteln durchzuführen.

Dem gegenüber stehen als Nachteile:

- 1.) Das aufgereinigte Nukleotid wird verunreinigt durch Material von der Dünnschichtplatte, welches nur teilweise durch Zentrifugation abgetrennt werden kann.
- 2.) Bei Synthese von Verbindungen mit hoher spezifischer Radioaktivität wird die Kontamination der Geräte und des Arbeitsplatzes, sowie die Abschirmung der Radioaktivität, zum Problem.

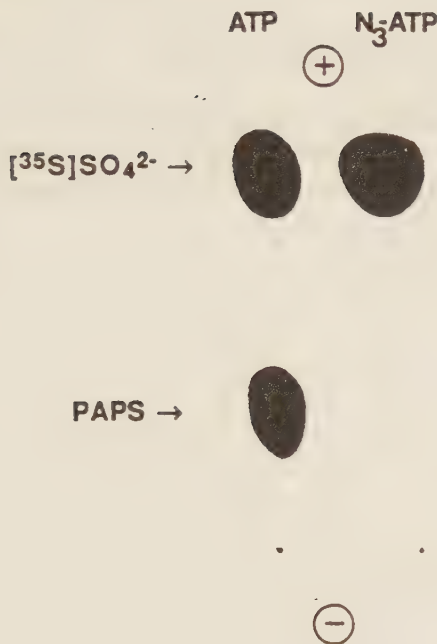


Abbildung 14

Versuch der Synthese von 8-N₃-[³⁵S]PAPS. 8-N₃-ATP und [³⁵S]Sulfat wurden 1 Stunde lang bei 30°C in der Gegenwart von ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und anorganischer Pyrophosphatase inkubiert. Zur Kontrolle wurde die Reaktion unter denselben Bedingungen nur mit ATP anstelle von [8-N₃]ATP durchgeführt. Nach 1 Stunde wurde ein Probe jeder Reaktion durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5, 20 Minuten, 500V) und anschließender Autoradiographie analysiert. Das Autoradiogramm ist abgebildet. Die rechte Spur zeigt den Fortschritt der Reaktion unter Verwendung von 8-N₃-ATP und [³⁵S]Sulfat, die linke Spur zeigt den entsprechenden Fortschritt der Reaktion unter Verwendung von ATP und [³⁵S]Sulfat. Die Positionen von Sulfat und PAPS sind durch Pfeile markiert, sie wurden aus den bekannten R_F-Werten errechnet. Die Auftragungsorte der Proben sind durch die Punkte angedeutet.

Als mögliche Trennverfahren, die diese Nachteile nicht aufweisen, können in Erwägung gezogen werden:

- 1.) Säulenchromatographie mit DEAE-Zellulose (Czarnecki et al., 1979)
- 2.) Ionen-Paar Chromatographie auf C-18 "reversed phase" HPLC-Säulen (Pennings und Kempen, 1979)

Während die erste Möglichkeit vor allem zur Aufreinigung von Verbindungen mit hoher spezifischer Radioaktivität geeignet ist, ist die zweite Methode für Verbindungen mit geringer spezifischer Radioaktivität wahrscheinlich das Mittel der Wahl.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

TEIL 2:

CHARAKTERISIERUNG VON P85

5.1. Entdeckung von p85 in Fraktionen der Rindernebenniere

Kürzlich wurde durch direktes Photoaffinitätsmarkieren von Golgi-Membranfraktionen des Rindernebennierenmarkes mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 34kDa (p34) identifiziert (Lee et al., 1984). Jedoch wurden in den beschriebenen Experimenten keine Membranproteine markiert. Ein Grund hierfür könnte die geringe Konzentration von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ in dem beschriebenen Reaktionsansatz sein, sie betrug 20nM (Endkonzentration). Es lag daher nahe, die Experimente mit dem $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ zu wiederholen, dessen Synthese in dem vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde. Dabei konnte die Konzentration von PAPS im Reaktionsansatz um das fünfzigfache, auf $1\mu\text{M}$ Endkonzentration, erhöht werden. Zusätzlich war die spezifische Aktivität des "neuen" $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ mit 7.4 TBq/mmol 3mal so groß wie die spezifische Aktivität des $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, das für die Identifizierung von p34 verwendet wurde. In den ersten Experimenten wurden nicht Golgi-Membranfraktionen des Rindernebennierenmarkes, sondern zytoplasmatische und mikrosomale Fraktionen der Rindernebenniere verwendet. Mark und Rinde wurden dabei nicht voneinander getrennt. Dadurch ergab sich die Möglichkeit in der zytoplasmatischen Fraktion sowohl Steroidsulfotransferasen aus der Rinde als auch Phenolsulfotransferasen aus dem Mark in einer Fraktion zu erhalten. Für das Experiment wurden ganze Rindernebennieren homogenisiert und der postnukleäre Überstand nach Zentrifugation bei 800g durch Zentrifugation bei 100,000g in eine zytoplasmatische und eine mikrosomale Fraktion getrennt. Diese Fraktionen werden von jetzt ab als 100K-Überstand und 100K-Sediment bezeichnet. Jede Fraktion wurde mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ unter der Einstrahlung von UV-Licht auf Eis inkubiert. Die Kontrollproben wurden durch Abdeckung mit Aluminiumfolie vor dem UV-Licht geschützt. Um mögliche Bindungsstellungen im Lumen von Membranvesikeln zugänglich zu machen, wurden die Proben mit 1% Triton

X-100 versetzt. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert (Abbildung 15, Seite 54).

Dabei wurden im 100K-Überstand Proteine nur durch die Einstrahlung von UV-Licht radioaktiv markiert. Ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 34kDa war die am stärksten markierte Bande im 100K-Überstand. Dieses Protein wurde auch im 100K-Sediment gefunden. Das Verhältnis von markiertem 34kDa-Protein im 100K-Sediment zu markiertem 34kDa-Protein im 100K-Überstand war 1:11. Da das 34kDa-Protein genau das gleiche Molekulargewicht wie das von Lee et al. (1984) beschriebene p34 hat und seine Eigenschaften, soweit charakterisiert, mit diesem p34 übereinstimmen, sind beide Proteine wahrscheinlich identisch. Neben p34 wurden im 100K-Überstand zwei weitere Proteine mit scheinbaren Molekulargewichten von 60kDa und 85kDa beobachtet, die vergleichsweise schwach markiert waren. Außerdem wurde in dem oberen Teil des Gels ein hoher Hintergrund an Radioaktivität beobachtet, ohne dass diskrete Banden aufgelöst waren.

Im 100K-Sediment wurden neben p34 keine weiteren Proteine UV-abhängig markiert. Unerwarteterweise wurde jedoch die UV-unabhängige Markierung eines Proteins mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 85kDa (p85) beobachtet (Abbildung 15, Seite 54). Dieses Protein war wahrscheinlich nicht mit dem 85kDa-Protein des 100K-Überstandes identisch, da dieses im Gegensatz zu p85 nur durch die Einwirkung von UV-Strahlung radioaktiv markiert wurde. Neben p85 wurde kein weiteres Protein in der mikrosomalen Fraktion ohne die Einstrahlung von UV-Licht markiert. In Folgeexperimenten wurde die Verteilung von p85 in Rindernebennierenrinde und Rindernebennierenmark bestimmt. Dabei wurde im 100K-Sediment der Rindernebennierenrinde 13mal mehr Radioaktivität an p85 gebunden, als im 100K-Sediment des Rindernebennierenmarkes (Daten nicht gezeigt).

5.1.1. p85 wird durch [3'-³²P]PAPS markiert

Die völlig unerwartete Markierung eines Proteins durch [3'-³²P]PAPS ohne die Einstrahlung von UV-Licht warf die Frage auf, ob diese Markierung durch [3'-³²P]PAPS oder durch eine radioaktive Verunreinigung des [3'-³²P]PAPS

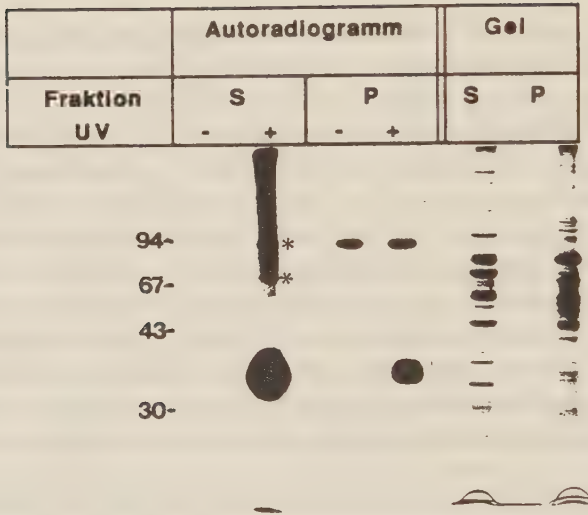


Abbildung 15

Photoaffinitätsmarkierung der Rindernebenniere mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$. 80µg einer zytoplasmatischen Fraktion (S) und einer partikulären Fraktion (P) der Rindernebenniere, die durch Zentrifugation eines postnukleären Überstandes bei 100,000g gewonnen wurden (siehe 3.4.2.), wurden mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ 30 Minuten lang bei 40° C inkubiert. Dabei wurde UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254nm eingestrahlt (UV+). Die Kontrollproben (UV-) wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt (siehe 3.5. und 3.5.3.). Die Proteinkonzentration war bei allen Proben gleich. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Das Autoradiogramm und das mit Coomassie-Blau gefärbte Gel sind abgebildet. Da sich die Proteinmuster durch die UV-Einstrahlung nicht änderten, sind nur zwei der vier Proteinspuren abgebildet. Zwei Proteine in der zytoplasmatischen Fraktion (S), die durch UV-Einstrahlung markiert wurden, sind markiert (*).

bewirkt wurde. Diese Verunreinigung könnte entweder $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oder aber eine unbekannte Verbindung sein, die bei der Dünnschichtelektrophorese ein ähnliches Laufverhalten wie $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ hat. Dieser Verdacht wurde noch verstärkt durch die Beobachtung, daß nur 0.01% der eingesetzten Radioaktivität an p85 banden. Deshalb wurde zuerst versucht, p85 mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ gleicher spezifischer Aktivität wie $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ zu markieren (Abbildung 16, Seite 56). Während in einer Kontrollreaktion mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ p85 klar radioaktiv markiert wurde, war in der entsprechenden Reaktion mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ keine Markierung von p85 nachzuweisen. Im Gegensatz zu der Kontrollreaktion wurde die Inkorporation von Radioaktivität in eine Vielzahl von Proteinbanden beobachtet. Um die Möglichkeit auszuschließen, daß p85 durch eine andere Verunreinigung des $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markiert wurde, wurden nach der präparativen Auftrennung von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) nicht nur die $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ enthaltende Region von der Platte gekratzt, sondern auch 2 Streifen von 2 cm Breite oberhalb und unterhalb dieser Region (Abbildung 17, Seite 57). Das Material dieser Streifen wurde im folgenden genauso behandelt wie das Material des $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Streifens. Nach Elution der Zellulose mit Triethylammoniumhydrogenkarbonat wurde die Zellulose durch Zentrifugation entfernt und der Überstand durch Lyophilisation eingeeengt (siehe 3.2.6.). Das Endvolumen der Proben entsprach dem Volumen der $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Lösung, deren Konzentration war $5\mu\text{M}$. Anschließend wurde 20K-Sediment mit dem Eluat der beiden Streifen und dem entsprechenden $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (Abbildung 17, Seite 57). Dabei band die meiste Radioaktivität an p85, wenn das 20K-Sediment mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert worden war. Eine geringere radioaktive Markierung von p85 wurde beobachtet, wenn das 20K-Sediment mit dem Material inkubiert worden war, das von dem Streifen unterhalb der $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Region auf der Dünnschichtplatte stammte. Keine radioaktive Markierung von p85 wurde beobachtet, wenn das 20K-Sediment mit dem Material inkubiert worden war, das von dem Streifen oberhalb der $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Region auf der Dünnschichtplatte stammte. Daraus kann geschlossen werden, daß die radioaktive Markierung von p85 tatsächlich durch $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ erfolgte. Aller Wahrscheinlichkeit nach war $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ als Verunreinigung in dem Material enthalten, das unterhalb der $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Region von der Platte gekratzt worden war. Dies war wohl die Ursache für die radioaktive Markierung von

[3'-³²P]- [γ-³²P]-
PAPS ATP

94-

67-

43-

Abbildung 16

Versuch der Markierung von p85 mit [γ-³²P]ATP. [γ-³²P]ATP mit einer spezifischen Aktivität von 185TBq/mmol wurde durch Verdünnen mit nicht radioaktivem ATP auf eine spezifische Aktivität von 3.7TBq/mmol eingestellt. Anschließend wurde 0.5/1.5M Interphase (siehe 3.4.2.) mit diesem [γ-³²P]ATP (3.7TBq/mmol) oder [3'-³²P]PAPS (3.7TBq/mmol) inkubiert (siehe 3.5.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Das Autoradiogramm ist abgebildet.

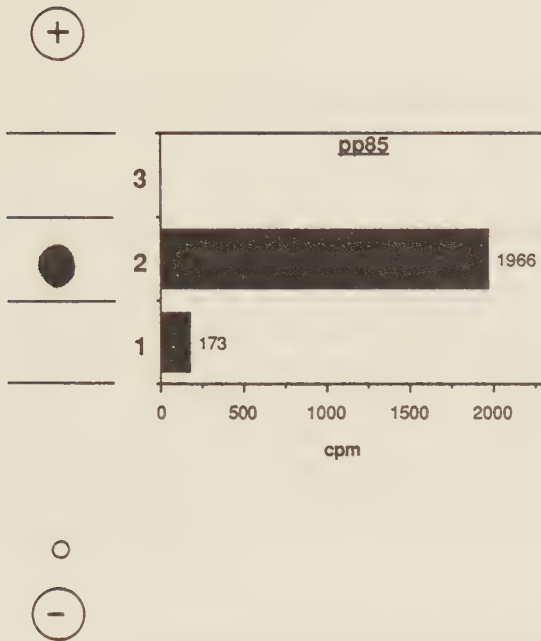


Abbildung 17

p85 wird durch $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markiert. Um zu zeigen, daß p85 durch $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markiert wurde und nicht durch eine Verunreinigung, die während der Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) ein ähnliches Laufverhalten wie PAPS hatte, wurde nicht nur die Region der Dünnschichtplatte abgekratzt, die $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ enthielt (2), sondern auch Streifen von 2cm Breite unterhalb (1) und oberhalb (3) dieser Region. Das Material dieser Streifen wurde genauso weiterverarbeitet wie das Material aus der $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ Region. Eine repräsentative Dünnschichtplatte ist abgebildet. Die Position von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ wurde aus dem bekannten R_f -Wert berechnet. Anschließend wurde eine Golgi-angereicherte Fraktion der Rindernebenniere (0.8/1.0M Interphase, siehe 3.4.3.) mit dem Material der Streifen (1) und (3) und mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ (2) inkubiert (siehe 3.5.). In Abweichung zum Standardassay betrug der pH-Wert der Reaktionslösung 4. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Der Graph basiert auf den so ermittelten Werten; pp85 steht für radioaktiv markiertes p85.

p85 nach Inkubation des 20K-Sedimentes mit diesem Material.

5.2. Rahmenbedingungen der Markierung von p85

Die biochemische Charakterisierung von p85 wurde begonnen mit Versuchen zur Bestimmung von Rahmenbedingungen wie Methoden zur Beendigung der Reaktion, Reaktionszeit, pH-Wert der Reaktionslösung, Notwendigkeit von divalenten Kationen etc. Alle Markierungsexperimente, die im folgenden beschrieben werden, wurden unter den Bedingungen des sogenannten Standardassay vorgenommen (siehe 3.5.). Abweichungen von diesem Standardassay werden erwähnt. Dabei wurde auf die Bestrahlung der Proben mit UV-Licht verzichtet, die Reaktionsdauer auf 1 Minute verkürzt (s. 5.2.3.).

5.2.1. Präparation der 0.5/1.5M-Interphase

Für die folgenden Experimente wurde die Präparation der partikulären Fraktion der Rindernebenniere modifiziert. Nun wurden Rindernebennieren in 0.3M Saccharose homogenisiert, das Homogenat bei 800g für 10 Minuten zentrifugiert und der resultierende postnukleäre Überstand bei 20,000g sedimentiert. Für einige Experimente wurde dieses 20,000g-Sediment, von jetzt ab als 20K-Sediment bezeichnet, nach Resuspension in 0.3M Saccharose verwendet. Sonst wurde das 20K-Sediment weiter fraktioniert, um die Konzentration an Lysosomen abzusinken und damit das Risiko der Proteolyse durch lysosomale Proteasen zu verringern. Dazu wurde das 20K-Sediment in 0.5M Saccharose aufgenommen und über das gleiche Volumen 1.5M Saccharose geschichtet. Dieser Zweistufengradient wurde in einem Festwinkelrotor bei 20,000g zentrifugiert. Das Material an der Phasengrenze zwischen 0.5M und 1.5M Saccharose wurde gesammelt und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Dieses Material wird - von jetzt ab - als 0.5/1.5M-Interphase bezeichnet. Alle Fraktionen wurden durch Inkubation mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ (Standardassay, siehe 3.5.) auf den Gehalt an markierbarem p85 untersucht (Abbildung 18, Seite 59). Dabei konnte p85 bereits im Homogenat nachgewiesen werden. Die Bindung von Radioaktivität an p85 pro mg Protein in den

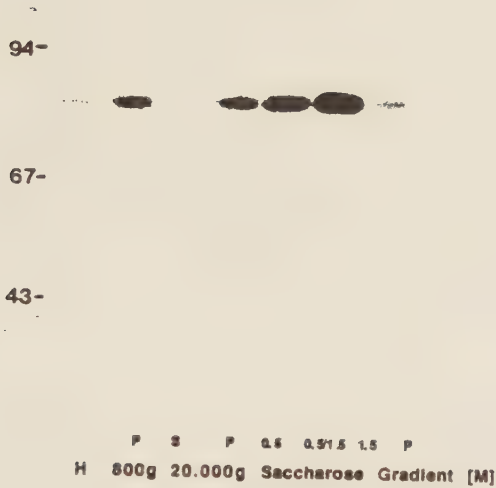


Abbildung 18

Markierung von p85 in verschiedenen Fraktionen der Rindernebenniere. Eine Rindernebenniere wurde homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation in mehrere Fraktionen aufgetrennt (siehe 3.4.2). Die Proteinkonzentration in den verschiedenen Fraktionen wurden nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt (siehe 3.3.1). 30µg Protein der einzelnen Fraktionen wurden mit $[3^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Dabei wurde für jede Fraktion dieselbe Menge an Protein verwendet. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Das Autoradiogramm ist abgebildet. Die Tabelle (Seite 60) zeigt neben der Proteinbilanz, die Ausbeute an p85 ausgehend vom Homogenat, sowie die spezifische Aktivität von p85 in den einzelnen Fraktionen. Die spezifische Aktivität wurde definiert als die Menge an p85 gebundene Radioaktivität pro mg Protein im Homogenat und willkürlich gleich 1 gesetzt.

Fraktion	Protein (g)	spezifische Aktivität	Ausbeute an radioaktiv markiertem p85 (%)
Homogenat	4.2	1.0	100
800 g Sediment	1.0	1.7	41
20 K Überstand	2.3	0.4	21
20 K Sediment	0.7	1.8	25
Summe	4.0	-	87

20 K Sediment	0.7	1.8	25
0.5 M Saccharose	0.1	3.0	7
0.5M/1.5M Interph.	0.4	5.2	50
1.5M Saccharose	0.06	1.2	2
Sediment	0.03	0.2	0
Summe	0.6	-	59

Abbildung 18

folgenden Fraktionen war etwas höher in dem 20K-Sediment, als in dem 800g Sediment. Ein weiterer Anstieg der Bindung von Radioaktivität an p85 pro mg Protein wurde in der 0.5/1.5M-Interphase beobachtet, die aus dem 20,000g Sediment entwickelt worden war. Die Berechnung der Menge an Radioaktivität, die in einer gesamten Fraktion an p85 gebunden wurde, zeigte, daß in allen Fraktionen des Gradienten zusammen genommen mehr Radioaktivität an p85 gebunden worden war, als in dem ursprünglichen 20K-Sediment. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt (Abbildung 18, Seite 60). Im Gegensatz dazu ergab die Summe der Radioaktivität, die insgesamt an p85 im 800g Sediment, 20K Überstand und 20K-Sediment gebunden wurde, annähernd die gleiche Menge an Radioaktivität, die an p85 in dem gesamten Homogenat gebunden wurden.

5.2.2. Charakterisierung der Markierungsbedingungen für p85

War die Markierung von p85 durch [3'-³²P]PAPS abhängig davon, ob die Proteine denaturiert waren oder nicht? Um diese Frage zu beantworten, wurden Proteine des 20K-Sedimentes und der 0.5/1.5M-Interphase entweder vor oder nach der Zugabe von [3'-³²P]PAPS auf unterschiedliche Weise denaturiert und anschließend auf radioaktiv markiertes p85 untersucht. So führte die Inkubation von partikulären Fraktionen der Rindernebenniere mit [3'-³²P]PAPS, mit Beendigung der Reaktion durch Trichloressigsäure-Präzipitation, zu der Markierung von p85 (Abbildung 19, Seite 63, 1. Spur). Wurde jedoch [3'-³²P]PAPS in Trichloressigsäure-Lösung vorgelegt und die Proben in die Trichloressigsäure-Lösung pipettiert, wurde keine Markierung von p85 beobachtet (Abbildung 19, Seite 63, 2. Spur). Dasselbe Muster ergab sich, wenn die Proteine durch Pipettierung der Reaktionslösung in heißen SDS-Probenpuffer denaturiert wurden. p85 wurde nur dann markiert, wenn der Reaktionslösung vor der Hitzebehandlung der Proben [3'-³²P]PAPS zugefügt wurde (Abbildung 19, Seite 63, 3. Spur). Keine Markierung von p85 wurde beobachtet, wenn [3'-³²P]PAPS in dem heißen SDS-Probenpuffer vorgelegt wurde (Abbildung 19, Seite 63, 4. Spur). Überraschenderweise wurde p85 auch dann markiert, wenn die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt worden waren (Abbildung 19, Seite 63, 5. Spur). Dagegen konnte keine Markierung

beobachtet werden, wenn die Proben nach Zugabe des SDS-Probenpuffers in kochendem Wasser erhitzt wurden, bevor [$3'$ - 32 P]PAPS zugegeben wurde (Abbildung 19, Seite 63, 6. Spur). Wenn die Reaktion durch Erhitzen in kochendem Wasser, ohne die Zufügung von SDS-Probenpuffer, beendet wurde, wurde nicht p85 sondern ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 130kDa markiert (Abbildung 19, Seite 63, 7. Spur). Auch die Markierung des 130kDa Proteins fand nicht statt, wenn die Proben vor Zugabe von [$3'$ - 32 P]PAPS in kochendem Wasser erhitzt worden waren (Abbildung 19, Seite 63, 8. Spur). Die Markierung dieses Proteins kann nicht ohne weiteres auf unspezifische Vernetzung von Proteinen durch das Erhitzen zurückgeführt werden, da die Proteinfärbung der Probe im Gel keine Unterschiede im Bandenmuster zeigte im Vergleich zu einer Probe, die in Gegenwart von SDS-Probenpuffer abgekocht worden war. Auf eine weitere Charakterisierung von p130 wurde - aus Zeitgründen - verzichtet. Aus diesen Versuchen folgt, daß die radioaktive Markierung von p85 nur möglich war,

Abbildung 19

Markierung von p85 unter verschiedenen Bedingungen. 20K-Sediment der Rindernebenniere (siehe 3.4.2.) wurde mit [$3'$ - 32 P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.), wobei verschiedene Markierungsbedingungen getestet wurden. Anschließend wurden die Proben durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet. Die verschiedenen Markierungsbedingungen waren: Nach der Inkubation mit [$3'$ - 32 P]PAPS wurden die Proteine mit dem 10fachen Volumen (500 μ l) 10%iger Trichloressigsäure gefällt und anschließend in SDS-Probenpuffer resuspendiert (Spur 1). Die Reaktionslösung (Proteine, Puffer, Salze) wurde in das 10fache Volumen (500 μ l) 10%iger Trichloressigsäure pipettiert, wobei [$3'$ - 32 P]PAPS in der Trichloressigsäure vorgelegt wurde (Spur 2). Die Reaktionslösung (Proteine, Puffer, Salze), deren Volumen auf 20 μ l reduziert worden war, wurde in 480 μ l SDS-Probenpuffer, der in kochendem Wasser erhitzt wurde, pipettiert. [$3'$ - 32 P]PAPS war entweder in der Reaktionslösung enthalten (Spur 3) oder wurde in dem SDS-Probenpuffer vorgelegt (Spur 4). Die Reaktionslösung wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und entweder vor der Zugabe von [$3'$ - 32 P]PAPS (Spur 5) oder nach der Zugabe von [$3'$ - 32 P]PAPS (Spur 6) in kochendem Wasser erhitzt. Die Proben wurden entweder vor der Zugabe von [$3'$ - 32 P]PAPS (Spur 7) oder nach der Zugabe von [$3'$ - 32 P]PAPS (Spur 8) in kochendem Wasser erhitzt. Erst danach den Proben wurde SDS-Probenpuffer zugesetzt.

Proteine	Proteine	Proteine	SDS	Proteine	Proteine	Proteine	Proteine
↓	↓	↓	(95°C)	In SDS	↓	↓	↓
PAPS	TCA	PAPS	PAPS	PAPS	↓	PAPS	kochen
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
TCA	PAPS	SDS	Proteine	↓	↓	kochen	PAPS
↓	↓	(95°C)		↓	↓	↓	↓
SDS	SDS			kochen	PAPS	SDS	SDS

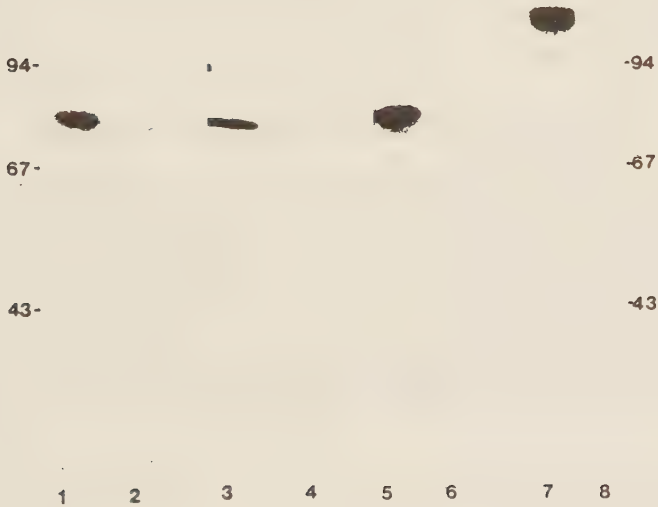


Abbildung 19

wenn die Proteine der entsprechenden Probe nicht denaturiert worden waren. Dabei zeigte sich, daß p85 ähnlich wie einige Proteasen nicht ohne weiteres durch SDS inaktiviert werden konnte.

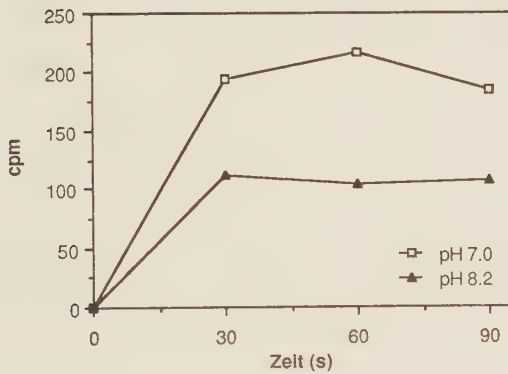
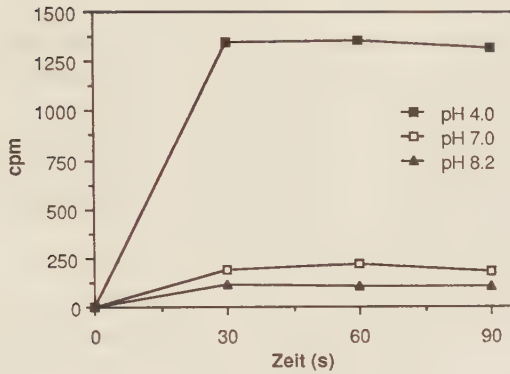
Bereits die Stabilität der radioaktiven Markierung von p85 gegenüber Trichloressigsäure-Präzipitation und Erhitzen in kochendem Wasser ließ vermuten, daß die Markierung kovalenter Natur war. Dies wurde bestätigt durch die Beobachtung, daß die radioaktive Markierung von p85 auch stabil gegenüber Relektrophorese war. So wurden nach 24 Stunden Elektroelution (150 V konstante Spannung) mit anschließender Gelelektrophorese 75% der ursprünglich an p85 gebundenen Radioaktivität zurückgewonnen (siehe Abbildung 54, Seite 131).

5.2.3. Markierung von p85 bei verschiedenen pH-Werten

Die Charakterisierung von p85 wurde in einem Zeitraum von 3 1/2 Jahren durchgeführt. Dabei wurde das Puffersystem des sogenannten Standardassay zweimal geändert, zuerst von pH 8 (NH_4HCO_3) auf pH 4 (Essigsäure/Natriumacetat) und dann auf pH 7 (MOPS/NaOH). Diese Änderungen beeinflussten nur die Menge der an p85 gebundenen Radioaktivität, nicht jedoch die Geschwindigkeit, mit der die Markierung eintrat (Abbildung 20, Seite 65). Bei allen verwendeten Puffersystemen änderte sich

Abbildung 20

Markierung von p85 bei verschiedenen pH-Werten. 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit $[3\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert. (siehe 3.5.). In Abweichung zum Standardassay wurden die Inkubationen bei Raumtemperatur vorgenommen. Außerdem wurde der Puffer der Reaktionslösungen geändert. Die verwendeten Puffer waren: 50mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ (pH 4), 50mM MOPS/NaOH (pH 7 und pH 8.2). Die Proben wurden für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem



Szintillationscocktail gezählt. Die Darstellung basiert auf den Werten der Szintillationszählung. Der untere Graph zeigt dieselben Werte wie der obere Graph, nur ist der Maßstab der Ordinate verändert.

die Menge der von p85 in einem Zeitraum von 30 - 90 Sekunden gebundenen Radioaktivität nicht wesentlich. Die radioaktive Markierung von p85 nach 60 Sekunden Inkubationszeit war somit unter allen pH-Bedingungen nicht gegen mögliche Schwankungen der Reaktionszeit anfällig. Die Absenkung des pH-Wertes unter 4 führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der Menge der an p85 gebundenen Radioaktivität, sondern zu einer deutlichen Reduktion der an p85 gebundenen Radioaktivität (Daten nicht gezeigt).

Wurde die Markierung von p85 bei verschiedenen pH-Werten und bei Verwendung von SDS vorgenommen, so wurde die meiste Radioaktivität bei einem pH von 6.1 an p85 gebunden. Um dies zu zeigen, wurde die Reaktionslösung mit geeigneten Puffern auf bestimmte pH-Werte eingestellt, dann wurde ungepufferter SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proben für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ zugesetzt und die Reaktion nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur durch Erhitzen in kochendem Wasser beendet. Die Analyse der Proben zeigte, daß p85 nur dann markiert wurde, wenn der pH-Wert der Reaktionslösung größer als 5.4 war (Abbildung 21, Seite 67). Bei einem pH-Wert der Reaktionslösung, der kleiner als 5.4 war, wurde keine Markierung von p85 beobachtet. Offensichtlich wurde von p85 unter diesen Bedingungen durch den SDS-Probenpuffer inaktiviert, während es bei einem pH-Wert über 5.4 nicht inaktiviert wurde. Die Inaktivierung von p85 durch SDS war also pH-abhängig.

5.2.4. Stimulierung der Markierung von p85 durch divalente Kationen

Die Markierung von p85 wurde durch Magnesium- und Manganionen stimuliert. In Gegenwart von 5mM Magnesiumchlorid und 1mM Manganchlorid wurde im Vergleich mit den anderen Proben die meiste Radioaktivität an p85 gebunden (Abbildung 22, Seite 68). Die Entfernung von Magnesium- oder Manganionen aus der Reaktionslösung reduzierte die an p85 gebundene Radioaktivität um etwa 20%. Markierung in der Abwesenheit beider Kationen reduzierte die an p85 gebundene Radioaktivität auf 30% der Radioaktivität, die in Gegenwart beider Kationen an p85 gebunden worden war. Eine weitere

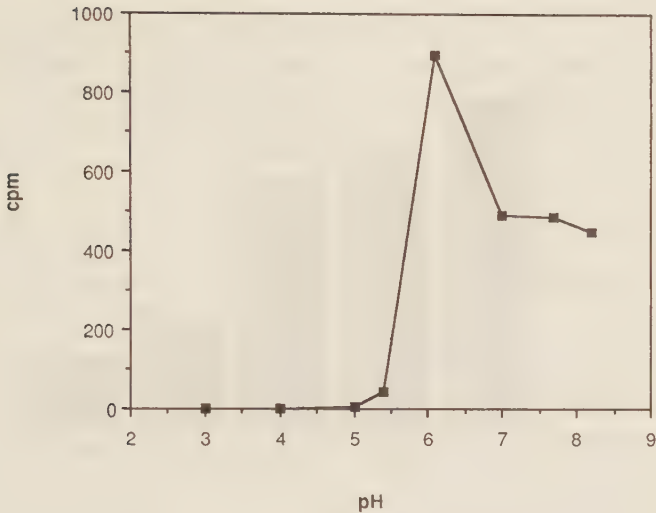


Abbildung 21

Markierung von p85 in SDS-Probenpuffer bei verschiedenen pH-Werten. Die 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit den Salzen des Standardassays (siehe 3.5.), sowie verschiedenen Puffern versetzt :50mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ (pH 3.0, 4.0, 5.0 und 5.4) und 50mM MOPS/NaOH (pH 6.1, 7.0, 7.7 und 8.2). Danach wurde ungepufferter SDS-Probenpuffer (Endkonzentrationen: 3%(w/v)SDS, 10%(v/v)Glycerin, 3.3% 2-Mercaptoethanol und eine Spur Bromphenolblau) zugesetzt und die Reaktionslösung für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ zugegeben und in Abweichung zum Standardassay 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert (siehe 3.5.). Die Reaktion wurde durch Erhitzen der Proben in kochendem Wasser beendet. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85, mit Hilfe des Autoradiogramms, auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Die dargestellte Kurve basiert auf den gezählten Werten.

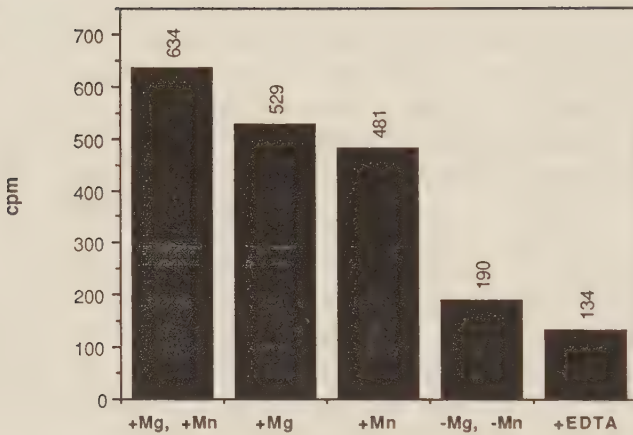


Abbildung 22

Markierung von p85 in der An- und Abwesenheit von divalenten Kationen. 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (3.5.). Dabei wurden die Konzentration der divalenten Kationen Magnesium und Mangan im Reaktionsansatz variiert. Die Inkubationen wurden in der Gegenwart von 5mM MgCl_2 und 1mM MnCl_2 (+Mg,+Mn), 5mM MgCl_2 (+Mg), 1mM MnCl_2 (+Mn), ohne Magnesium und Mangan (-Mg,-Mn) oder ohne Magnesium und Mangan, aber mit 10mM EDTA (+EDTA), vorgenommen. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Die gezeigte Darstellung basiert auf diesen Werten.

Abnahme der an p85 gebundenen Radioaktivität wurde beobachtet, wenn beide Kationen ausgeschlossen wurden und die Reaktionslösung mit 10mM EDTA versetzt wurde. Die Verwendung von Magnesiumchlorid und Manganchlorid im Reaktionsansatz des Standardassay erklärt sich aus diesen Versuchen.

5.2.5. Markierung von p85 mit verschiedenen Konzentrationen von PAPS

Die Synthese von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ ergab eine Ausbeute von maximal 10nmol $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ mit einer spezifischen Aktivität von 3.7TBq/mmol oder 7.4TBq/mmol. Um nicht zuviel Zeit durch die Synthesen zu verlieren, wurde für den Standardassay eine Endkonzentration von $1\mu\text{M}$ $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ verwendet. Diese Konzentration erlaubte maximal 200 Reaktionen aus einer $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Synthese. Wieviel markierbares p85 unter diesen Bedingungen tatsächlich markiert worden war, wurde durch die Inkubation der 0.5/1.5M-Interphase in verschiedenen Konzentrationen an $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ bestimmt (Abbildung 23, Seite 70). Durch Inkubation in $1\mu\text{M}$ $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ konnte nur etwa 10% des markierbaren p85 markiert werden. Die Konzentration von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ bei halbmaximaler Sättigung des markierbaren p85 war ca. $10\mu\text{M}$. Eine Sättigung von p85 mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ wurde erst bei Konzentrationen von mehr als $200\mu\text{M}$ PAPS erreicht. Ausgehend von der bekannten spezifischen Aktivität von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ wurde die Abundanz von p85 in der 0.5/1.5M-Interphase kalkuliert. Danach beträgt das Verhältnis von p85 zum gesamten Proteingehalt 1:20,000. Dies ist natürlich nur ein Minimalwert, da nicht bekannt ist, ob alles p85, das in der Probe vorhanden ist, auch markiert werden kann.

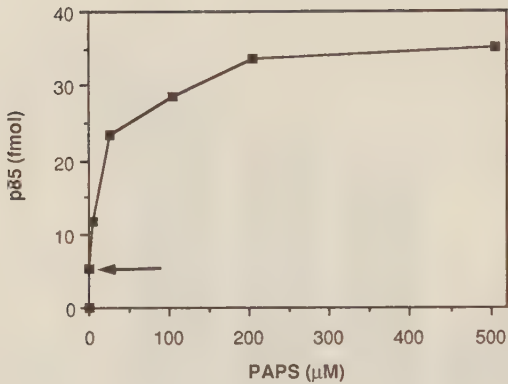


Abbildung 23

Markierung von p85 mit unterschiedlichen Konzentrationen an PAPS. 0.5/1.5 Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). In Abweichung zum Standardassay wurden für die Reaktionen die Konzentration und die spezifische Aktivität des eingesetzten PAPS variiert. Die verwendeten $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Konzentration und die entsprechenden spezifischen Aktivitäten waren: $1\mu\text{M}$ (7.4 TBq/mmol), $5\mu\text{M}$ (7.4 TBq/mmol), $25\mu\text{M}$ (1.5 TBq/mmol), $105\mu\text{M}$ (352 GBq/mmol), $205\mu\text{M}$ (181 GBq/mmol), $505\mu\text{M}$ (74 GBq/mmol). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Anschließend wurden aus den - so ermittelten - cpm-Werten für die verschiedenen Konzentrationen von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, die Menge an $[^{32}\text{P}]\text{Phosphat}$ berechnet, die an p85 gebunden waren. Dies war durch die Kenntnis der verschiedenen spezifischen Aktivitäten von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ möglich. Es ergab sich die dargestellte Kurve. Die Menge an $[^{32}\text{P}]\text{Phosphat}$, die bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ gebunden wird, ist durch den eingezeichneten Pfeil hervorgehoben.

5.3. Biochemische Charakterisierung von p85

5.3.1. Isoelektrische Fokussierung von p85

Der isoelektrische Punkt von p85 wurde durch zweidimensionale Gelelektrophorese bestimmt. Dabei wurde gleichzeitig ein weiterer Hinweis auf die geringe Abundanz von p85 erhalten. Dazu wurden Proteine in der ersten Dimension isoelektrisch fokussiert (O'Farrell, 1975) und danach in der zweiten Dimension durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Diese Prozedur wurde nach der Inkubation des 20K-Sedimentes mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ durchgeführt und das resultierende Gel wurde durch Autoradiographie analysiert. Der isoelektrische Punkt von p85, der durch die isoelektrische Fokussierung bestimmt werden kann, lag bei einem pH-Wert von ca. 5.5. Dies war unabhängig von dem pH-Wert der Reaktionslösung, der für die Markierung von p85 benutzt wurde. Außerdem wurden Isoformen von p85 beobachtet (Abbildung 24, Seite 72). Die isoelektrischen Punkte dieser Isoformen lagen bei einem größeren pH-Wert, als der isoelektrische Punkt von p85. Ein Nachweis von p85 durch Coomassie Blau-Färbung des Geles war nicht möglich, deshalb kann p85 kein abundantes Protein sein.

5.3.2. Die Markierung von p85 ist PAPS-spezifisch

Um die Spezifität der Markierung von p85 durch $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ zu testen, wurden Proben in Gegenwart verschiedener nicht radioaktiver Nukleotide mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert. Dabei war die Konzentration der nicht radioaktiven Nukleotide 100fach größer als die Konzentration von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ (Abbildung 25, Seite 73). Zugabe von nicht radioaktivem PAPS zu der Reaktion reduzierte die Markierungseffizienz von p85 auf ca. 20% des ursprünglichen Wertes. Die Markierung von p85 wurde nicht vollständig verhindert, weil - durch die im Reaktionsansatz verwendete $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ -Konzentration - p85 nicht mit PAPS gesättigt war. Nur Nukleotide mit einer 3'-Phosphatgruppe am Ribosering konnten die radioaktive Markierung von p85 mit gleicher Effizienz wie nicht radioaktives PAPS reduzieren. 5'-AMP konnte mit PAPS als einziges Nukleotid ohne eine 3'-Phosphatgruppe um die Bindung an p85 konkurrieren. Dabei war die Wirkung von 5'-AMP auf die Markierung von p85 etwa halb so

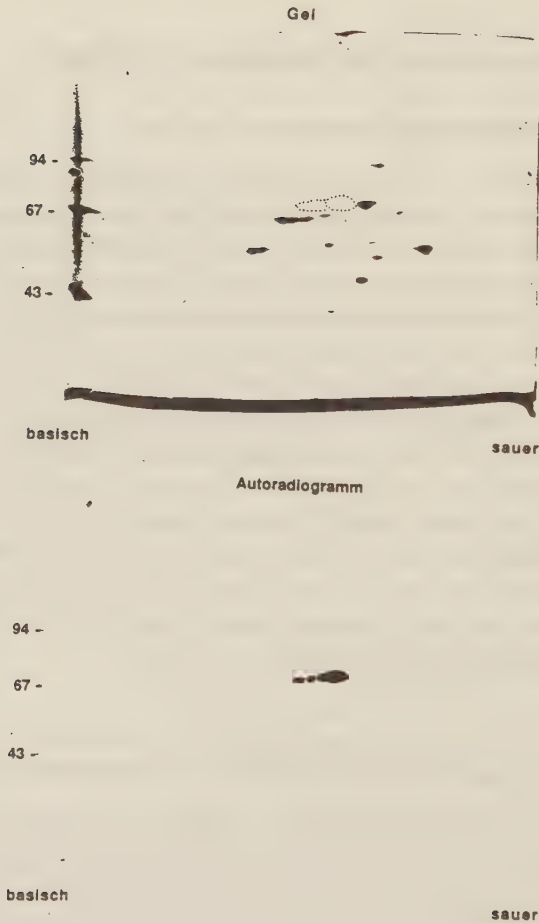


Abbildung 24

Zweidimensionale Elektrophorese von p85. 425µg Protein des 20K-Sedimentes wurde mit $[3\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Abweichend vom Standardassay wurde die Probe bei einem pH-Wert von 4.0 inkubiert. Die Probe wurde durch zweidimensionale Elektrophorese analysiert, wobei eine isoelektrische Fokussierung mit einem pH-Bereich von 3.5 - 9.5 als erste Dimension und eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese als zweite Dimension durchgeführt wurde (siehe 3.3.3.). Die Gele wurden durch Autoradiographie analysiert. Das mit Coomassie gefärbte Gel und das Autoradiogramm sind abgebildet. Das Gebiet des Geles, welches sich mit dem Fleck auf dem Autoradiogramm deckt, ist umrandet (gepunktete Linie).

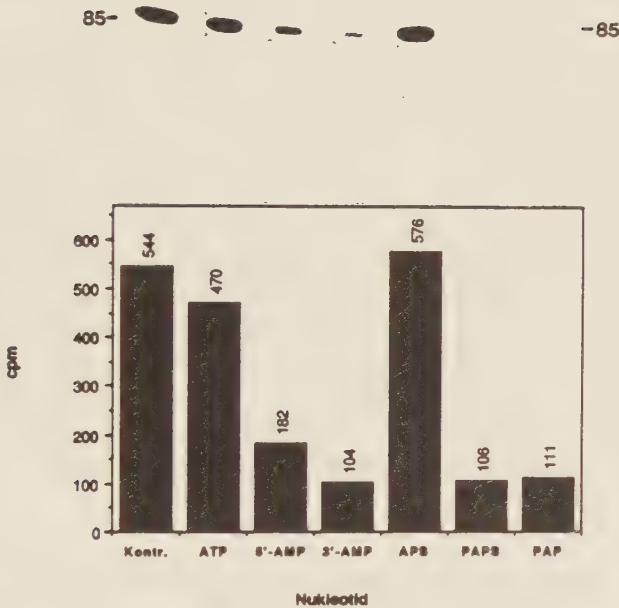


Abbildung 25

Konkurrenz verschiedener Nukleotide mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ um die Bindung an p85. Eine Membranfraktion der Rindernebenniere (Detergenzphase nach Triton X-114 Kondensation (siehe 3.4.5.), ausgehend vom 20K-Sediment (siehe 3.4.2.)) wurde mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (3.5). Die Inkubation wurde in Gegenwart verschiedener nicht radioaktiver Nukleotide vorgenommen (alle Angaben als Endkonzentration): $100\mu\text{M}$ ATP, $100\mu\text{M}$ APS, $100\mu\text{M}$ 5'-AMP, $100\mu\text{M}$ 3'-AMP, $100\mu\text{M}$ PAPS und $100\mu\text{M}$ PAP. Der Kontrollprobe (H_2O) wurde Wasser anstelle eines Nukleotides zugesetzt. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Das Autoradiogramm und die entsprechenden cpm-Werte sind abgebildet.

groß wie die der Nukleotide mit einer 3'-Phosphatgruppe. Dagegen wurde die Markierung von p85 durch cAMP nicht beeinflußt (Daten nicht gezeigt). Selbst bei 100fachen Überschuß beeinflussten APS und ATP die Markierung von p85 nicht.

Die beobachtete spezifische Inhibition der Markierung von p85 durch Verbindungen mit einer 3'-Phosphatgruppe am Ribosering bestätigte die Beobachtung, daß die radioaktive Markierung von p85 nicht durch eine Verunreinigung aus dem zur Synthese verwendeten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ herrührte (siehe 5.1.1.). Daß nicht nur eine 3'-Phosphatgruppe am Ribosering, sondern auch die Anwesenheit der Sulfatgruppe in 5'-Stellung für die radioaktive Markierung von p85 notwendig war, wurde durch ein Markierungsexperiment mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$ gezeigt. Dazu wurde $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$ aus $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ durch dreißigminütige Inkubation in 0.1N HCl bei 37°C für 30 Minuten dargestellt. Die anschließende Inkubation von Proben mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$ ergab keine radioaktive Markierung von p85, während im Kontrollexperiment, das unter identischen Bedingungen mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ durchgeführt worden war, die Markierung von p85 beobachtet wurde (Abbildung 26, Seite 75).

5.3.3. Markierung von p85 mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$, $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ und $[2,5',8\text{-}^3\text{H}]\text{PAPS}$

Um den Teil von PAPS zu bestimmen, der an p85 gebunden wird, wurde versucht, p85 mit $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ (5.6 TBq/mmol), $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ (3.7 TBq/mmol) und $[2,5',8\text{-}^3\text{H}]\text{PAPS}$ (1.67 TBq/mmol) zu markieren. Zum Vergleich, die spezifische Aktivität des verwendeten $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ betrug 3.7TBq/mmol. $[2,5',8\text{-}^3\text{H}]\text{PAPS}$ konnte nicht mit höherer spezifischer Aktivität synthetisiert werden, da das für die Synthese verwendete $[2,5',8\text{-}^3\text{H}]\text{ATP}$ bereits die höchste spezifische Aktivität hatte, die gekauft werden konnte. Als Kontrolle für die Markierungsreaktion wurde die UV-abhängige Markierung von p34 (siehe 5.1.) benutzt. Da p34 nur durch die Einstrahlung von UV-Licht mit PAPS markiert werden kann, muß PAPS über den Adeninring an p85 gebunden werden. Folglich müßte p34 nicht nur durch $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, sondern auch durch $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$, $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ und $[2,5',8\text{-}^3\text{H}]\text{PAPS}$ markiert werden. Deshalb wurden verschiedene Fraktionen der Rindernebenniere mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$,

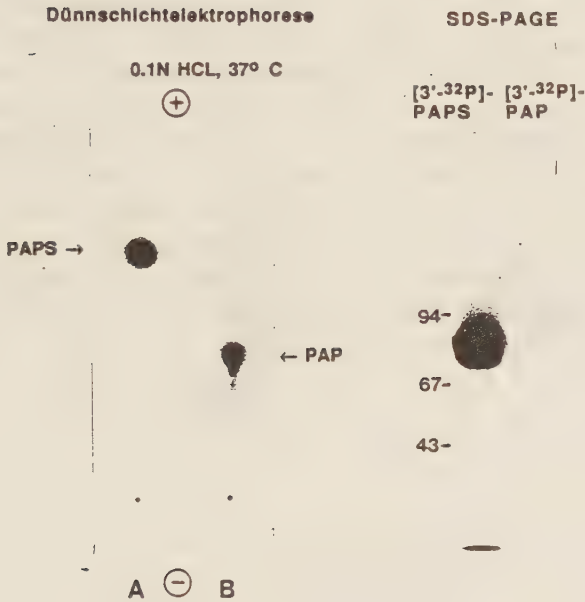


Abbildung 26

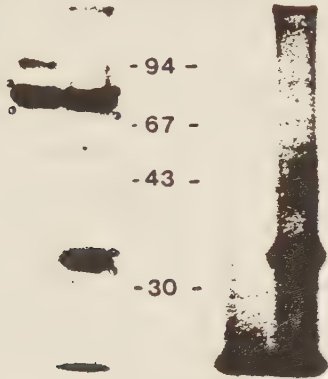
Versuch der Markierung von p85 mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$. $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$ wurde aus $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ durch Inkubation in 0.1N HCl 30 Minuten lang bei 37°C gewonnen. Danach wurde die Reaktionsmischung durch 1N NaOH neutralisiert und die Konversion von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ zu $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$ durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5, 1 Stunde, 500V) überprüft (siehe 3.2.6.). Das Autoradiogramm der Dünnschichtplatte ist abgebildet, Spur A zeigt das Ausgangsmaterial, Spur B das Material nach der Inkubation. Die Positionen von PAPS und PAP, die durch Referenzstandards bestehend aus nicht radioaktiven Nukleotiden bestimmt wurden, sind durch Pfeile markiert. Anschließend wurde 20K-Sediment der Rindernebenniere (siehe 3.4.2.) mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ oder $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$ inkubiert (siehe 3.5.). Der Probe, die mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert worden war, wurden 100mM NaCl (Endkonzentration) zugesetzt. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Das Autoradiogramm ist abgebildet.

[^{35}S]PAPS, [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS und [$2,5',8\text{-}^3\text{H}$]PAPS 30 Minuten lang auf Eis inkubiert und anschließend durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Tatsächlich wurde p34 von allen radioaktiven PAPS-Verbindungen markiert, sofern UV-Licht eingestrahlt worden war (Abbildung 27, Seite 77). Im Gegensatz wurde p85 unter denselben Bedingungen nur durch [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS radioaktiv markiert und nicht durch [^{35}S]PAPS, [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS und [$2,5',8\text{-}^3\text{H}$]PAPS, auch dann nicht, wenn UV-Licht eingestrahlt worden war. Auch eine einminütige Inkubation von partikulären Fraktionen der Rindernebenniere mit [^{35}S]PAPS, [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS und [$2,5',8\text{-}^3\text{H}$]PAPS für 1 Minute ohne die Einstrahlung von UV-Licht ergab keine Markierung von p85 (Daten nicht gezeigt). Daraus folgt, daß anscheinend nur die Phosphatgruppe in 3'-Stellung effizient und kovalent an p85 bindet.

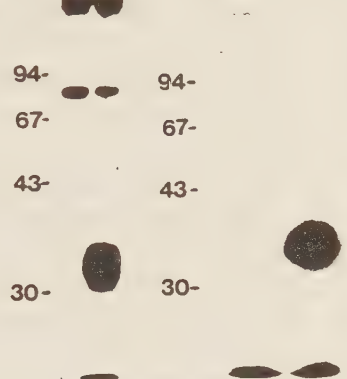
Abbildung 27

Markierungsexperimente mit verschieden radioaktiv markiertem PAPS. Insgesamt wurden drei verschiedene Gewebefraktionen für die Experimente verwendet. 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS (3.7 TBq/mmol) und [^{35}S]PAPS (5.6 TBq/mmol), an Golgi-Vesikeln angereicherte Fraktionen des Rindernebennierenmarkes (0.8/1.0M Interphase, siehe 3.4.3) wurden mit [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS (3.7TBq/mmol) und [$5'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS (3.7 TBq/mmol) bei pH 8 und eine andere mikrosomale Fraktion der Rindernebenniere (100,000g Sediment, siehe 3.4.1.) wurde bei pH 7 mit [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS (3.7TBq/mmol) und [$2,5',8\text{-}^3\text{H}$]PAPS (1.7TBq/mmol) inkubiert. Alle Proben wurden 30 Minuten lang bei 4°C mit UV-Licht (254nm) bestrahlt. Kontrollproben (-UV) wurden durch Aluminiumfolie vor der UV-Strahlung geschützt (siehe 3.5. und 3.5.3.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet:

	[3'- ³² P]PAPS		[³⁵ S]PAPS	
UV	-	+	-	+



	[3'- ³² P]PAPS		[5'- ³² P]PAPS	
UV	-	+	-	+



	[3'- ³² P]PAPS		[2,5',8- ³ H]PAPS	
UV	-	+	-	+

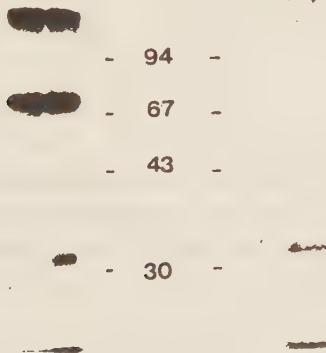


Abbildung 27

5.3.4. Charakterisierung der Phosphatbindung

An welche funktionelle Gruppe von p85 die 3'-Phosphatgruppe von PAPS band, wurde mit chemischen Methoden untersucht. Dazu wurde das 20K-Sediment mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde ein Streifen des Gels, das markiertes p85 enthielt, in 1N NaOH (pH 14) bei 40°C 1 Stunde lang inkubiert. Danach war kein markiertes p85 mehr nachweisbar, die Markierung war verloren gegangen. Hingegen führte eine Inkubation eines vergleichbaren Gelstreifens in einer Mischung aus 2-Propanol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 1:1:8 (pH 2.0) unter gleichen Bedingungen nicht zum Verlust der Markierung von p85 (Abbildung 28, A, Seite 79). Außerdem führte weder die Inkubation der 0.5/1.5M-Interphase in der Gegenwart von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ und NH_2OH im Vergleich zu einer Kontrollprobe nicht zu einer Verringerung der an p85 gebundenen Radioaktivität (Abbildung 28, B, Seite 79). Auch die Behandlung der 0.5/1.5M-Interphase mit NH_2OH nach der Inkubation mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ führte nicht zu einer Verringerung der radioaktiven Markierung von p85, im Vergleich zu einer Kontrollreaktion (Abbildung 28, C, Seite 79). Zusammengefaßt deuten diese Befunde

Abbildung 28

Einfluß von NaOH und NH_2OH auf die Markierung von p85. 20K-Sediment (A) oder 0.5/1.5M-Interphase (B,C) wurden mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Alle Proben wurden nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durch Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet.

(A) Die Inkubation wurde ohne den Zusatz von NH_2OH durchgeführt und in Abweichung vom Standardassay bei pH-8 der Reaktionslösung. Die Proben wurden dann durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, gefolgt von Färben und Entfärben, analysiert. Anschließend wurden 2 Proteinspuren des Gels ausgeschnitten und 1-Stunde lang bei 40°C entweder in 2-Propanol, Essigsäure, Wasser (1:1:8) (NaOH-) oder in 1N NaOH (NaOH+) inkubiert. Danach wurden die Gelstreifen gewässert und getrocknet.

A		B		C	
NaOH		NH ₂ OH		NH ₂ OH	
-	+	-	+	-	+



- 85 -



(B) Die Inkubation mit [3'-³²P]PAPS wurde entweder in der Gegenwart von 0.8M NH₂OH (+) oder als Kontrolle in Gegenwart von 0.64M NaCl (-) vorgenommen (siehe 3.5.). Abweichend vom Standardassay wurden 50mM Essigsäure/Natriumacetat (pH 5.4) als Reaktionspuffer verwendet, die Reaktionszeit auf 10 Minuten verlängert und die Reaktionstemperatur auf Raumtemperatur erhöht.

(C) Die Inkubation mit [3'-³²P]PAPS wurde unter den Bedingungen des Standardassays (siehe 3.5.) vorgenommen. Die Reaktion wurde durch Trichloressigsäure-Präzipitation beendet. Danach wurden die Proteine in 1% SDS resuspendiert und 10 Minuten lang in 50mM Essigsäure/Natriumacetat (pH 5.4) bei Raumtemperatur, entweder mit 0.8M NH₂OH (+) oder als Kontrolle mit 0.64M NaCl(-) inkubiert.

daraufhin, daß die betreffende Phosphatbindung ein Sauerstoffester ist und nicht ein Amid, Anhydrid oder Schwefelester (Fujitaki und Smith, 1984). Da Phosphoramidate extrem instabil im Sauren sind, kann die Phosphatbindung kein Amid sein. Die Möglichkeit eines gemischten Anhydrids wird durch die Unempfindlichkeit der Markierung von p85 gegenüber NH_2OH und der Stabilität der Phosphatbindung bei pH 2 ausgeschlossen. Auch Phosphocystein kann ausgeschlossen werden, da diese Form der Phospho-Aminosäurebindung bei einem pH-Wert um 4 extrem instabil ist. Im Gegensatz dazu wurde bei pH 4 die meiste Radioaktivität im Vergleich zu anderen pH-Werten an p85 gebunden, selbst dann, wenn die Proben mit einem pH-Wert von 4 in kochendem Wasser erhitzt wurden. Von den verbleibenden Möglichkeiten Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin können die letzteren ausgeschlossen werden, weil im Gegensatz zu der Phosphoserinbindung sowohl die Phosphotyrosinbindung als auch die Phosphothreoninbindung bei basischen pH-Werten stabil sind. Somit scheint die 3^{H} -Phosphatgruppe von PAPS an ein Serin von p85 zu binden.

5.3.5. Phosphoaminosäureanalyse von p85

Die Phosphoaminosäureanalyse von p85 bestätigte die chemische Charakterisierung der Phosphoaminosäurebindung. Dazu wurde ein Gelstück, das markiertes p85 enthielt, erschöpfend mit Trypsin verdaut. Die resultierenden Peptide wurden bei einer zweistündigen Inkubation durch 6N HCl bei 110°C weiter gespalten. Die Reaktionsprodukte, Aminosäuren, wurden durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese mit anschließender Autoradiographie analysiert (Lee und Huttner, 1983). Das Autoradiogramm zeigte einen radioaktiven Fleck, der sich in derselben Position wie der nicht radioaktive Phosphoserinstandard befand (Abbildung 29, Seite 81). Vergleichbar radioaktiv markiertes Phosphothreonin oder Phosphotyrosin wurde nicht beobachtet. Phosphoserin war die von p85 markierte Aminosäure unabhängig davon, ob die Markierung von p85 bei pH 4 oder pH 7 durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Insgesamt bestätigte die Phosphoaminosäureanalyse die chemische Charakterisierung der Phosphoaminosäurebindung vollständig.

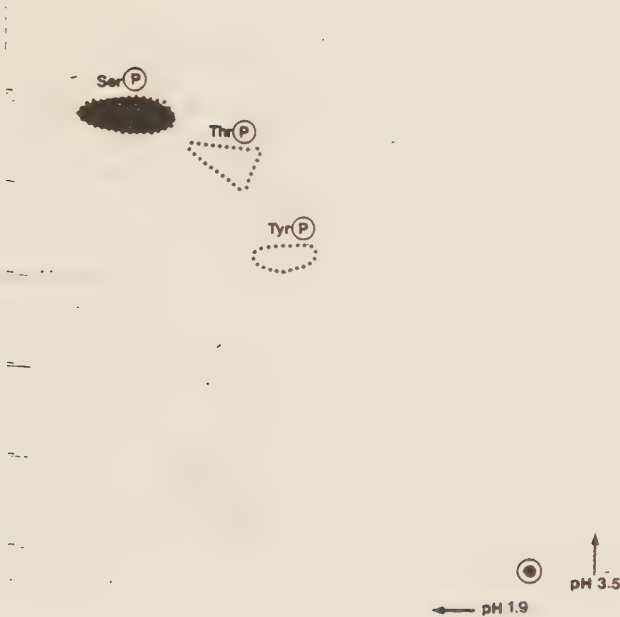


Abbildung 29

Phosphoamino säureanalyse von markiertem p85. 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit $[3\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). In Abweichung zum Standardassay betrug der pH-Wert der Reaktionslösung 4. Die Probe wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Anschließend wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert und ausgeschnitten. Das Gelstück wurde dann mit Trypsin für insgesamt 24 Stunden inkubiert und die aus dem Gel eluierten Peptide durch Inkubation in 6N HCl bei 110°C weiter gespalten (siehe 3.3.8.). Nach Entfernen der Salzsäure wurde der Rückstand durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese und anschließende Autoradiographie der Dünnschichtplatte analysiert. Das Autoradiogramm dieser Platte ist abgebildet. Der Puffer der ersten Dimension der Dünnschichtelektrophorese hatte einem pH von 1.9 (HCOOH 2.7%, CH_3COOH 7.8%, H_2O 90%), der Puffer der zweiten hatte einem pH von 3.5 (CH_3COOH 5%, Pyridin 0.5%, H_2O 94.5%). Der Probe wurden nicht radioaktive Standards von Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin zugesetzt. Ihre Positionen wurden durch Ninhydrin-Färbung festgestellt und sind durch die gepunkteten Kreise angedeutet. Der Ursprung der Elektrophorese ist durch einen Kreis angedeutet.

5.3.6. Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen

Um die Frage zu beantworten, ob PAPS an einer oder an mehreren Stellen von p85 band, wurde radioaktiv markiertes p85 aus der 0.5/1.5M-Interphase 24 Stunden mit Trypsin bei 37°C verdaut. Anschließend wurde der Reaktionsmischung Chymotrypsin zugesetzt und der Verdau für 12 Stunden bei 37°C fortgesetzt. Danach wurden die Peptide durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) und Dünnschichtchromatographie (aufsteigend) in zwei Dimensionen aufgetrennt. Dabei wurde für die erste Dimension die Probe in der Mitte der Platte aufgetragen. Die Autoradiographie der Platte zeigte zwei radioaktive Peptide (Abbildung 30, Seite 83). Da die beiden Peptide ähnliches Laufverhalten zeigen, ist das schneller laufende Peptid wahrscheinlich eine stärker verdaute Form des langsamer laufenden Peptides. Dies wurde bestätigt durch den chymotryptischen Verdau von markiertem p85 aus einem 100K-Sediment der Rattenniere (siehe 5.4.3.). Dabei wurde nach eindimensionaler Dünnschichtelektrophorese bei pH 1.9 nur ein radioaktives Peptid beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Markierung von p85 durch PAPS schien somit ein sehr spezifischer Prozess zu sein, der nur an einer Stelle im Protein erfolgt.



Abbildung 30

Charakterisierung der Bindungsstelle. 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit $[3'-^32\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. p85 wurde mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und das Gelstück zuerst mit Trypsin und danach mit Chymotrypsin verdaut (siehe 3.3.7.). Die resultierenden Peptide wurden nach der Lyophilisation der Inkubationslösung durch Dünnschichtelektrophorese bei pH 1.9 (HCOOH 2.7%, CH_3COOH 7.8%, H_2O 90%) und aufsteigende Chromatographie (1-Butanol 37.5%, Pyridin 25%, Essigsäure 7.5%, Wasser 30%) analysiert. Das Autoradiogramm der entsprechenden Dünnschichtplatte ist abgebildet. Die Peptidlösung wurde in der Mitte der Dünnschichtplatte aufgetragen (Kreis). Die Peptide wanderten in Richtung der Kathode (-) nach links.

5.3.7. Zeitverlauf der Phosphorylierung von p85

Studien über die Kinetik der Phosphorylierungsreaktion sollten klären, ob die Phosphorylierung von p85 autokatalytisch erfolgte, oder ob sie durch eine externe Kinase katalysiert wurde. Zu diesem Zweck wurde p85 entweder in der Abwesenheit von SDS oder in der Anwesenheit von 1% SDS und 5facher Verdünnung des Reaktionsansatzes vorgenommen. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und zu den angegebenen Zeiten gestoppt (Abbildung 31, Seite 85). Die Markierung von p85 erfolgte so schnell, daß sie mit den verwendeten Methoden zeitlich nicht mehr aufgelöst werden konnte. Bereits nach ca. 2 Sekunden Inkubationszeit war annähernd das Maximum der Inkorporation von Radioaktivität in p85 erreicht, unabhängig davon, ob die Probe verdünnt war oder nicht.

Abbildung 31

Zeitverlauf der Phosphorylierung von p85. 23µg 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit [$3'$ - 32 P]PAPS inkubiert, dabei betrug das Endvolumen der Reaktionslösung entweder 20µl oder 100µl. Alle Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und durch Pipettieren der Reaktionslösung in 480 oder 400µl heißen SDS-Probenpuffer beendet (siehe 3.5.3.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Die abgebildeten Kurven basieren auf den so ermittelten cpm-Werten.

-SDS: Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 20µl. Die Proben wurden für 0, 2, 4, 15 und 30 Sekunden inkubiert.

+SDS, 5-fach verdünnt: Die Menge an Protein war dieselbe wie beim vorigen Experiment, jedoch war das Volumen um das 5fache vergrößert und 1% SDS (Endkonzentration) hinzugefügt worden. Das Endvolumen der Reaktionslösung betrug 100µl. Die Proben wurden für 0, 2, 4, 15 und 30 Sekunden inkubiert.

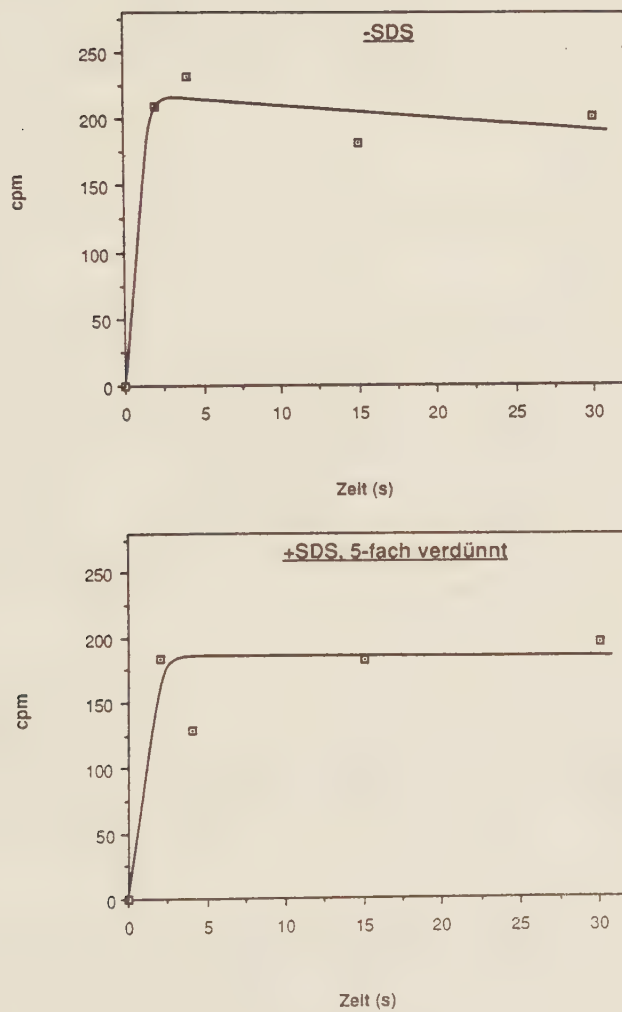


Abbildung 31

Wie die Phosphorylierungsreaktion sollte auch die Dephosphorylierungsreaktion darauf untersucht werden, ob sie autokatalytisch verläuft, oder ob sie durch eine externe Phosphatase katalysiert wird (Abbildung 32, Seite 87). Der einfachste Weg die Dephosphorylierung von p85 zu untersuchen, war die

Abbildung 32

Zeitverlauf der Dephosphorylierungsreaktion. 23µg 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurde mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert, dabei betrug das Endvolumen der Reaktionslösung entweder 20µl oder 100µl. Alle Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und durch Pipettieren der Reaktionslösung in 480 oder 400µl heißen SDS-Probenpuffer beendet (siehe 3.5.3.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Die abgebildeten Kurven basieren auf den so ermittelten cpm-Werten.

-SDS: Das Reaktionsvolumen betrug 20µl. Die Proben wurden 15 Sekunden lang mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert. Dann wurde die Reaktionslösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert, das 2µl 1mM PAPS enthielt (100 µM Endkonzentration) und die Reaktion für 2, 4, 15 und 30 Sekunden fortgesetzt (Gesamtreaktionszeiten: 17, 19, 30 und 45 Sekunden). Zur Kontrolle wurden Proben für 15, 30, und 45 Sekunden mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ ohne die Zugabe von PAPS inkubiert.

+SDS, 5fach verdünnt: Die Menge an Protein war dieselbe wie beim ersten Experiment, jedoch war das Volumen um das 5fache vergrößert und 1% SDS (Endkonzentration) hinzugefügt worden. Das Endvolumen der Reaktionslösung betrug 100µl. Die Proben wurden 15 Sekunden lang mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert. Dann wurde die Reaktionslösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert, das 10µl 1mM PAPS enthielt (100 µM Endkonzentration) und die Reaktion für 2, 4, 15 und 30 Sekunden fortgesetzt (Gesamtreaktionszeiten: 17, 19, 30 und 45 Sekunden). Zur Kontrolle wurden Proben für 15, 30 und 45 Sekunden mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ ohne die Zugabe von PAPS inkubiert.

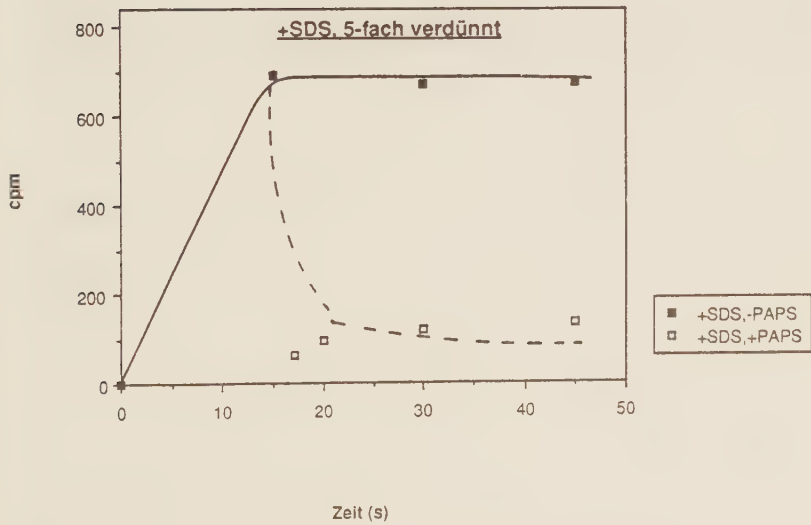
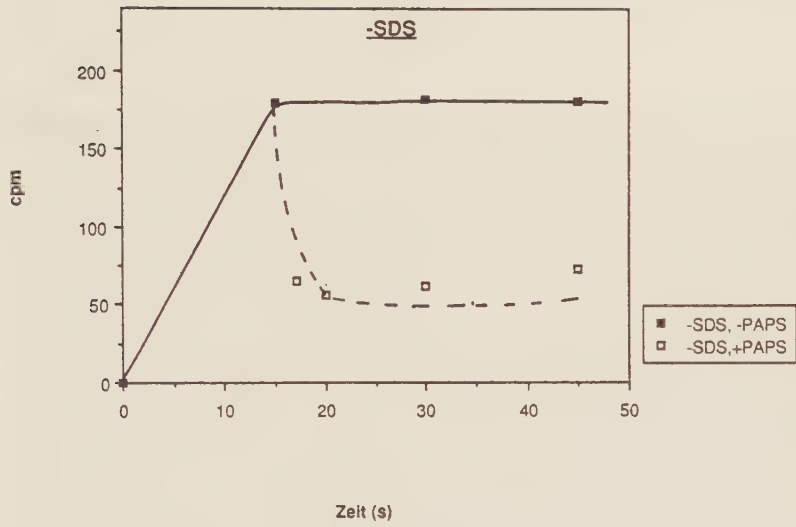


Abbildung 32

spezifische Aktivität von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ durch Zugabe eines 100fachen Überschusses von nicht radioaktivem PAPS zu senken und die Abnahme der radioaktiven Markierung von p85 zu beobachten. Dadurch kann jedoch die absolute Geschwindigkeit der Dephosphorylierungsreaktion erhöht werden. Deshalb kann über die tatsächliche Geschwindigkeit der Dephosphorylierung keine Aussage gemacht werden. Der Versuch wurde entweder in der Abwesenheit von SDS oder in der Anwesenheit von 1% SDS und 5facher Verdünnung der Reaktionslösung durchgeführt (Abbildung 32, Seite 87). 15 Sekunden nach Beginn der Reaktion wurden $100\mu\text{M}$ PAPS zugesetzt und die Reaktion für die angegebenen Zeiten fortgesetzt. Die Dephosphorylierungsreaktion konnte, wie die Phosphorylierungsreaktion, mit den verwendeten Methoden zeitlich nicht aufgelöst werden. Bereits nach 2 Sekunden erreichte sie einen Wert der sich durch längere Inkubation nicht wesentlich änderte. Die Abnahme der Inkorporation von Radioaktivität erfolgte, nach der Zugabe des nicht radioaktiven PAPS unabhängig von der Verdünnung der Proben gleich schnell. Somit scheint auch die Dephosphorylierung von p85 autokatalytisch zu erfolgen und nicht durch eine externe Phosphatase katalysiert zu werden.

5.3.8. Reversibilität der Markierung von p85

Die schnelle Phosphorylierung und Dephosphorylierung zeigte, daß die Bindung der 3'-Phosphatgruppe an p85 reversibel war. Dies wurde bestätigt durch die Veränderung der Menge an phosphoryliertem p85 im Verlauf von 15 Minuten Inkubation mit [3'-³²P]PAPS. Dazu wurde die 0.5/1.5M-Interphase verschieden lang mit [3'-³²P]PAPS bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die in der Reaktionslösung vorliegenden, radioaktiven Nukleotide durch Dünnschichtchromatographie auf PEI-Zellulose (pH 3.4) und anschließende Autoradiographie analysiert. Die Menge an phosphoryliertem p85 in denselben Proben wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie ermittelt. Dabei wurde festgestellt, daß die radioaktive Phosphorylierung von p85 nach 15 Sekunden Inkubation am stärksten war, dann ein Plateau erreichte und danach anfang stetig abzufallen (Abbildung 33, Seite 91). Gleichzeitig zeigte die Analyse der radioaktiven Nukleotide, daß die Konzentration von [3'-³²P]PAPS in der Reaktionslösung abnahm und freies Phosphat entstand. Also wurde die 3'-Phosphatgruppe von PAPS durch eine 3'-Nukleotidase abgespalten. Damit nahm die Konzentration von PAPS in der Reaktionslösung ständig ab, wobei PAPS in ein Nukleotid (APS oder 5'-AMP) umgewandelt wurde, das nicht oder nur schlecht mit PAPS um die Bindung an p85 konkurrieren konnte. Deshalb ist die gleichsinnige Abnahme der Phosphorylierung von p85 und der Konzentration von PAPS als ein Hinweis auf die Reversibilität der Phosphorylierung von p85 durch [3'-³²P]PAPS zu deuten.

5.3.9. Markierung von p85 nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Angesichts der schnellen Reversibilität der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von p85 und der Beobachtung einer 3'-Nukleotidaseaktivität in der 0.5/1.5M-Interphase stellte sich die Frage, ob p85 mit dieser 3'-Nukleotidase identisch ist. Außerdem stellte sich die Frage, ob neben der 3'-Nukleotidaseaktivität auch eine Sulfohydrolase Aktivität, die zu einer Abspaltung der Sulfatgruppe von PAPS führen würde, vorhanden war. Idealerweise müßte für einen solchen Versuch aufgereinigtes p85 verwendet werden, um Störungen des Versuchsergebnisses durch andere PAPS-abbauende Enzyme zu vermeiden. Dieses stand jedoch nicht zur Verfügung. Da jedoch p85 in SDS-Probenpuffer stabil war, wurde der Versuch unternommen p85 durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese partiell aufzureinigen und anschließend im Gel zu markieren. Unter diesen Bedingungen werden gleichzeitig mögliche Untereinheiten, mit einem von p85 verschiedenem Molekulargewicht, abgetrennt werden. Sollte p85 also nach dieser Prozedur noch markierbar sein, wäre dies ein weiterer Hinweis darauf, daß p85 nicht Teil eines Proteinkomplexes ist.

Abbildung 33

Zeitverlauf der Markierung von p85 und der Hydrolyse von [3'-³²P]PAPS. Mikrosomale Fraktionen der Rindernebennieren (0.5/1.5M-Interphase) wurden mit [3'-³²P]PAPS für verschiedene Zeiten inkubiert (siehe 3.5.1.). Die Reaktion wurde durch Pipettieren der Reaktionslösung in SDS-Probenpuffer, der in kochendem Wasser erhitzt wurde, beendet. Anschließend wurde jeder Probe 5µl entnommen, 1:10 mit Wasser verdünnt und durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5) und anschließende Autoradiographie analysiert. Die radioaktiven Nukleotide auf der Dünnschichtplatte wurden mit Hilfe des Autoradiogramms lokalisiert, ausgeschnitten und durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert. Der obere Graph basiert auf diesen Werten. Der Rest der Probe wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Deshalb wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Der untere Graph basiert auf diesen Werten.

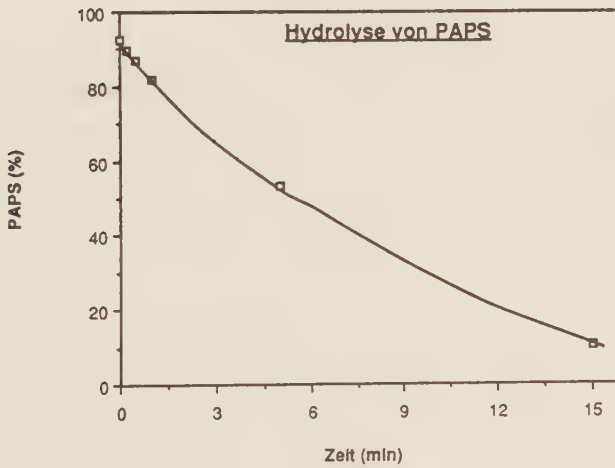
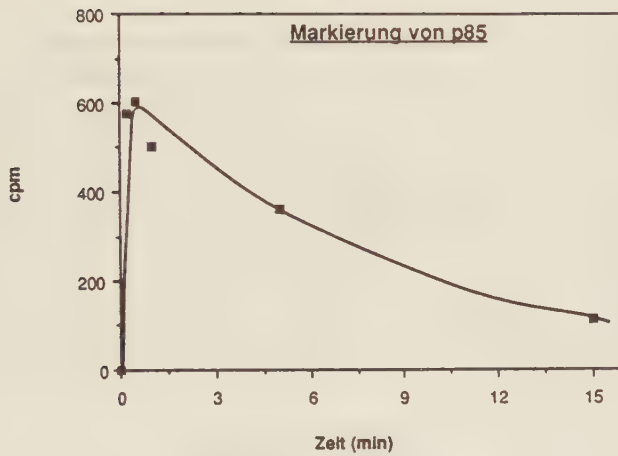


Abbildung 33

In Vorversuchen wurde beobachtet, daß die Markierungsfähigkeit von p85 verloren ging, wenn die Elektrophorese zu lange und bei hohen Spannungen (150V) durchgeführt worden war. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten die Laufzeit auf 180 Minuten und die Spannung auf 40V begrenzt. Nach dieser Zeit wurde die Region von 67 - 94 kDa, die durch Molekulargewichtsstandards lokalisiert worden war, aus dem Gel geschnitten und das Gelstück mit [3'-³²P]PAPS für 5 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Probe mit dem Gelstück durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abbildung 34, Seite 93). Tatsächlich konnte p85 nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese im Gel radioaktiv markiert werden.

5.3.10. Analyse der Reaktionsprodukte

Somit war die partielle Aufreinigung von aktivem p85 durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese möglich. In den folgenden Versuchen wurde die Dauer der Elektrophorese auf 90 Minuten begrenzt. Dies ergab einerseits eine ausreichende Trennleistung (auf Minigelen) und andererseits eine höhere Sicherheit, daß p85 nach der Elektrophorese noch aktiv war. Nach der Elektrophorese mit einer Dauer von 180 Minuten konnte p85 nicht in allen Fällen durch [3'-³²P]PAPS markiert werden. Deshalb wurde p85 durch neunzigminütige Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von 40V aufgetrennt. Danach wurde die Region des Molekulargewichtsbereiches von 67 - 94 kDa ausgeschnitten und die Gelstücke für verschiedene Zeiten mit [3'-³²P]PAPS, [3'-³²P]PAP, [5'-³²P]PAPS und [5'-³²P]APS inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde eine Probe der Reaktionslösung in 10%ige Trichloressigsäure-Lösung eingipettiert und nach der Extraktion der Trichloressigsäure durch Dünnschichtelektrophorese (pH 3.5.) analysiert. Nur die Inkubation eines Gelstückes mit [3'-³²P]PAPS führte zu der Abspaltung der radioaktiven 3'-Phosphatgruppe und der Entstehung von [³²P]Phosphat (Abbildung 35, Seite 95). In demselben Zeitraum und unter denselben Bedingungen wurde keine Freisetzung von Phosphat beobachtet, wenn ein Gelstück mit [3'-³²P]PAP inkubiert wurde. Ebenfalls keine nennenswerte Hydrolyse wurde beobachtet, wenn ein Gelstück, das keine Proteine enthielt,



Abbildung 34

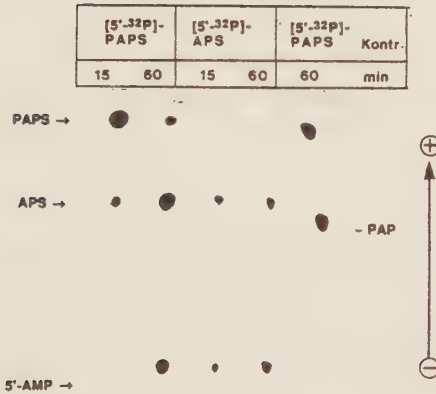
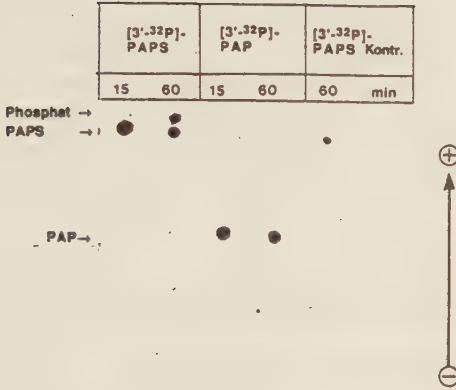
Markierung von p85 nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. 60µg 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 180 Minuten lang mit 40V konstanter Spannung aufgetrennt. Der Molekulargewichtsbereich von 67-94kDa, der durch die Molekulargewichtsstandards lokalisiert worden war, wurde ausgeschnitten. Anschließend wurden die Gelstücke mit [$3^{\prime}$ - ^{32}P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.2.). Nach Erhitzen in kochendem Wasser wurden die Proben inklusive Gelstück durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert.

60 Minuten lang zusammen mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert wurde. Somit enthielten die Gelstücke eine für PAPS-spezifische 3'-Nukleotidase Aktivität.

Die Inkubation eines Gelstückes mit $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ führte hauptsächlich zu der Bildung von $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{APS}$. Die gleichzeitig beobachtete Entstehung von $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{AMP}$ ist wahrscheinlich auf die nicht enzymatische Hydrolyse der Phosphosulfatbindung zurückzuführen. Die Beobachtung, daß $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ in einem Kontrollexperiment, in dem ein Gelstück ohne Proteine verwendet wurde, zu $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$ degradiert wurde, was nur durch nicht enzymatische Hydrolyse der Phosphosulfatbindung erklärt werden konnte (Abbildung 35, Seite 95), bestätigt diese Hypothese. $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{APS}$ wurde nur unwesentlich zu $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{AMP}$ degradiert, wenn es unter denselben Bedingungen wie $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ mit einem Proteine enthaltenden Gelstück inkubiert wurde. Demnach konnte eine Sulfohydrolase-Aktivität, die sich mit der Aktivität der PAPS-spezifischen 3'-Nukleotidase-Aktivität vergleichen ließe, in dem Experiment nicht beobachtet werden. Ob sich die beobachtete PAPS-spezifische 3'-Nukleotidase-Aktivität auf die Aktivität von p85 zurückführen läßt, konnte durch das Experiment nicht beantwortet werden.

Abbildung 35

Hydrolyse von PAPS nach der Inkubation von Gelstücken mit Proteinen des Molekulargewichtsbereiches 67 -94kDa. 60µg 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 90 Minuten lang mit 40V konstanter Spannung aufgetrennt. Der Molekulargewichtsbereich von 67-94kDa, der durch die Molekulargewichtsstandards lokalisiert worden war, wurde ausgeschnitten. Anschließend wurden die Gelstücke mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$, $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$, $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAP}$, und $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{APS}$ inkubiert (siehe 3.5.2.). Die Inkubationszeiten betrugen 15 und 60 Minuten. Die Kontrollen, Gelstücke ohne Proteine, wurden mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ und $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ 60 Minuten lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Pipettieren von 10µl der Reaktionslösung in 200µl 10%ige Trichloressigsäure beendet. Anschließend wurde die Trichloressigsäure bei Raumtemperatur



durch eine Mischung aus 1,1,2-Trichlortrifluorethan und Trioctylamin (3:2) extrahiert (siehe 3.5.2.). Danach wurden die radioaktiven Nukleotide durch Dünnschichtelektrophorese (pH3.5) und anschließende Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet. Die Positionen von 5'-AMP, PAP, APS, PAPS und Phosphat sind durch Pfeile gekennzeichnet. Ihre Positionen wurden durch Berechnung aus den bekannten R_f -Werten ermittelt.

durch eine Mischung aus 1,1,2-Trichlortrifluorethan und Trioctylamin (3:2) extrahiert (siehe 3.5.2.). Danach wurden die radioaktiven Nukleotide durch Dünnschichtelektrophorese (pH3.5) und anschließende Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet. Die Positionen von 5'-AMP, PAP, APS, PAPS und Phosphat sind durch Pfeile gekennzeichnet. Ihre Positionen wurden durch Berechnung aus den bekannten R_f -Werten ermittelt.

Jedoch wurde in einem anderen Experiment beobachtet, daß nach der Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Inkubation von Gelstücken des Molekulargewichtsbereiches von 67 - 94kDa mit [3'-³²P]PAPS, weder eine 3'-Nukleotidase Aktivität nachweisbar war, noch p85 radioaktiv markiert wurde. Die Gründe hierfür blieben unklar. (Daten nicht gezeigt).

5.4. Zellbiologische Charakterisierung von p85

5.4.1. p85 ist ein integrales Membranprotein

In allen bisher beschriebenen Fraktionierungsexperimenten wurde radioaktiv markiertes p85 ausschließlich in partikulären Fraktionen nachgewiesen. Die Frage stellte sich, ob p85 ein Membranprotein war. Um die Frage zu beantworten, ob p85 ein integrales Membranprotein, ein periphere Membranprotein oder ein in Vesikel eingeschlossenes, lösliches Protein ist, wurde eine partikuläre Fraktion der Rindernebenniere (20K-Sediment) zuerst mit Natriumkarbonat (Fukij et al., 1982) und anschließend mit Triton X-114 behandelt (Bordier, 1981).

Vor der Natriumkarbonatbehandlung wurden die Membranen mit 500mM Natriumchlorid gewaschen, um Proteine zu entfernen, die an den Membranen haften. Durch die nachfolgende Natriumkarbonatbehandlung wurden die Vesikel geöffnet, wodurch Inhaltsproteine freigesetzt wurden. Gleichzeitig wurden periphere Membranproteine von der Membran abgelöst. Integrale Membranproteine konnten zusammen mit den Membranen durch Zentrifugation sedimentiert werden. Die so erhaltene Membranfraktion wurde durch Triton X-114-Kondensation weiter fraktioniert. Membranproteine, die in Triton X-114 unlöslich waren, wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Kondensation des resultierenden Überstandes bei 30°C ergab zwei Fraktionen, eine mit Detergenz angereicherte Fraktion, die von jetzt ab als Detergenzphase bezeichnet wird, und eine an Detergenz abgereicherte Fraktion, die von jetzt ab als wäßrige Phase bezeichnet wird. Der Überstand und das Sediment der Zentrifugation nach der Natriumkarbonatbehandlung und die wäßrige Phase und die Detergenzphase der Triton X-114- Kondensation wurden durch

Inkubation mit [$3'$ - ^{32}P]PAPS auf den Gehalt an markierbarem p85 untersucht. Dabei wurde p85 ausschließlich in den Fraktionen markiert, in denen die Membranproteine angereichert sind. Dies sind das Sediment, welches nach der Natriumkarbonatbehandlung durch Zentrifugation erhalten wurde, und die Detergenzphase, die durch die Triton X-114 Kondensation entstand (Abbildung 36, Seite 98). Außerdem wurde radioaktiv markiertes p85 auch im Sediment der Zentrifugation, die nach der Auflösung des Natriumkarbonat-sedimentes in Triton X-114 durchgeführt wurde, gefunden. Dabei betrug das Verhältnis von in Triton X-114 gelöstem und ungelöstem p85 2:3. In den entsprechenden Fraktionen, in denen die Konzentration der Membranproteine verringert ist, dem Natriumkarbonatüberstand und der wäßrigen Phase, wurde kein markiertes p85 beobachtet. Daraus folgt, daß p85 ein integrales Membranprotein ist. Die Tatsache, daß p85 noch nach der Natriumkarbonatbehandlung und der Triton X-114-Kondensation markiert werden konnte, unterstützte die Theorie, daß p85 nicht Teil eines Proteinkomplexes ist.

5.4.3. Verdauen von p85 mit Neuraminidase

Die intrazelluläre Lokalisation von p85 wurde durch das Verdauen von p85 mit Neuraminidase eingegrenzt. Da Sialinsäuren erst im trans-Golgi an komplexe Kohlenhydratstrukturen gebunden werden (Roth und Berger, 1982), muß ein Protein, das Sialinsäuren gebunden hat, entweder Teil des trans-Golgi Kompartimentes sein, oder dieses Kompartiment auf dem Weg zu seinem endgültigen Bestimmungsort passiert haben. Deshalb wurde die 0.5/1.5M-Interphase zunächst mit Neuraminidase bei 37° C und anschließend mit [$3'$ - ^{32}P]PAPS inkubiert. Ein Kontrollexperiment wurde unter denselben Bedingungen nur ohne Neuraminidase durchgeführt (Abbildung 37, Seite 99). Durch die Inkubation mit Neuraminidase wurde das Molekulargewicht von p85 reduziert, was darauf hindeutet, daß p85 komplexe Kohlenhydratstrukturen mit Sialinsäuren enthält.

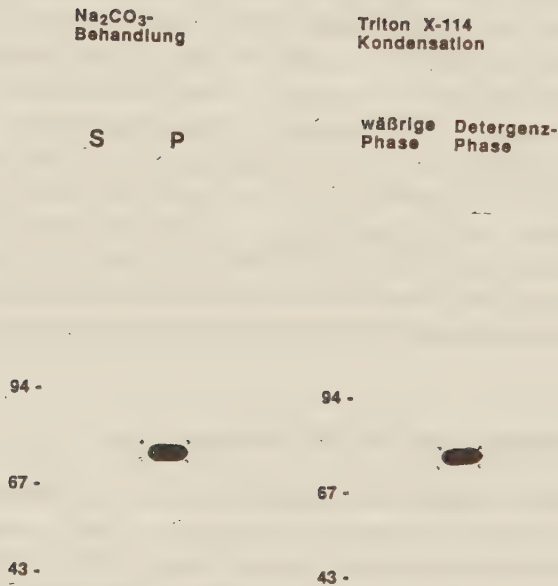


Abbildung 36

Natriumkarbonatbehandlung und Triton X-114-Kondensation. 20K-Sediment (siehe 3.4.2.) wurde mit Natriumkarbonat behandelt. Die von Natriumkarbonat nicht gelösten Membranen wurden durch Triton X-114-Kondensation weiter fraktioniert (siehe 3.4.5.). 50µg Protein des Überstandes und des Sedimentes der Zentrifugation nach der Natriumkarbonatbehandlung, sowie die Detergenzphase und die wäßrige Phase der Triton X-114-Kondensation wurden mit [³²P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.). Abweichend vom Standardassay wurden die Proben bei einem pH-Wert von 8.0 inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet.

Neuraminidase

- +

94 -

67 -



Abbildung 37

Neuraminidaseverdau von p85. 60µg des Proteins der 0.5/1.5M-Interphase(siehe 3.4.2.) wurden in An- oder Abwesenheit von 0.25U Neuraminidase (aus *Clostridium perfringens*) inkubiert (siehe 3.3.9.). Danach wurden die Proben mit $[3\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Das Autoradiogramm ist abgebildet.

5.4.4. Verteilung von markiertem p85 in verschiedene subzellulären Fraktionen des Rindernebennierenmarkes und der Rattenleber.

Die subzelluläre Fraktionierung des Rindernebennierenmarkes wurde durch Zentrifugation eines 20K-Sedimentes auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten durchgeführt (Abbildung 38, Seite 101) (Trifaro et al., 1976). Proben wurden aus der obersten Fraktion (0.3M Saccharose), von den verschiedenen Saccharosephasengrenzen und dem Sediment, das in 0.3M Saccharose resuspendiert worden war, gesammelt. Die Verteilung von p85 in den verschiedenen Fraktionen wurde durch Markierung mit [$3'$ - 32 P]PAPS bestimmt. Zusätzlich wurde die Aktivität der Tyrosylprotein-Sulfotransferase (TPST) in den verschiedenen Fraktionen bestimmt (Lee und Huttner, 1985). Da TPST ein Enzym des trans-Golgi ist (Baeuerle und Huttner, 1987), kann es als Leitenzym dieses Kompartimentes eingesetzt werden. Die Verteilung der spezifischen und gesamten Aktivität der TPST und von markiertem p85 in den verschiedenen Fraktionen war sehr ähnlich (Abbildung 39, A,B, Seite 102). Die größte spezifische Aktivität der TPST und das meiste markierte p85 (pro mg Protein) wurden in der Fraktion gefunden, die von der 0.8/1.0M Saccharose Interphase gesammelt wurde. Auch die Gesamtaktivität der TPST und die Menge an markiertem p85 (pro gesamter Fraktion) waren in dieser Fraktion am größten (Abbildung 39, B, Seite 103). Dies ist die Fraktion, in der auch die spezifische und die gesamte Aktivität von Galaktosyltransferase, dem klassischen Golgi-Leitenzym, am größten ist (Trifaro und Duerr, 1976, Lee und Huttner, 1985).

Um die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung der mikrosomalen Fraktion des Rindernebennierenmarkes zu bestätigen, wurde die subzelluläre Fraktionierung mit einem anderen Gewebe, nämlich Rattenleber, und einer anderen Methode wiederholt (Sztul, 1983). Dies war möglich, weil p85 auch in Fraktionen der Rattenleber nachgewiesen werden konnte (siehe unten). Jedoch war die Menge der Radioaktivität, die an p85 band, in der Rattenleber erheblich geringer als in vergleichbaren Fraktionen der Rindernebenniere.

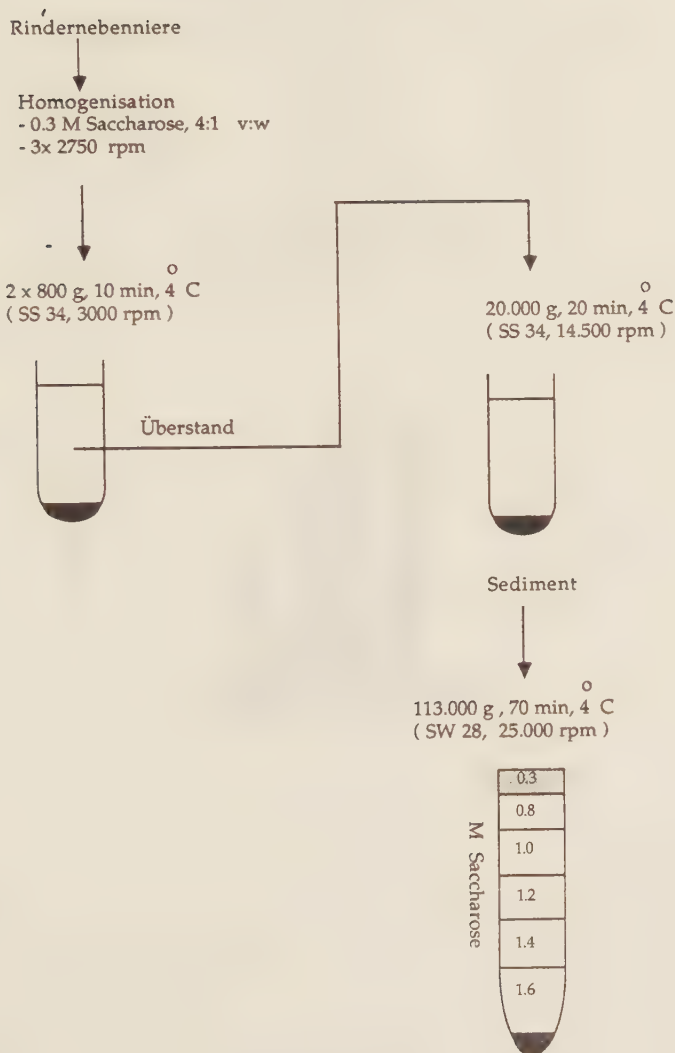


Abbildung 38

Subzelluläre Fraktionierung der Rindernebenniere

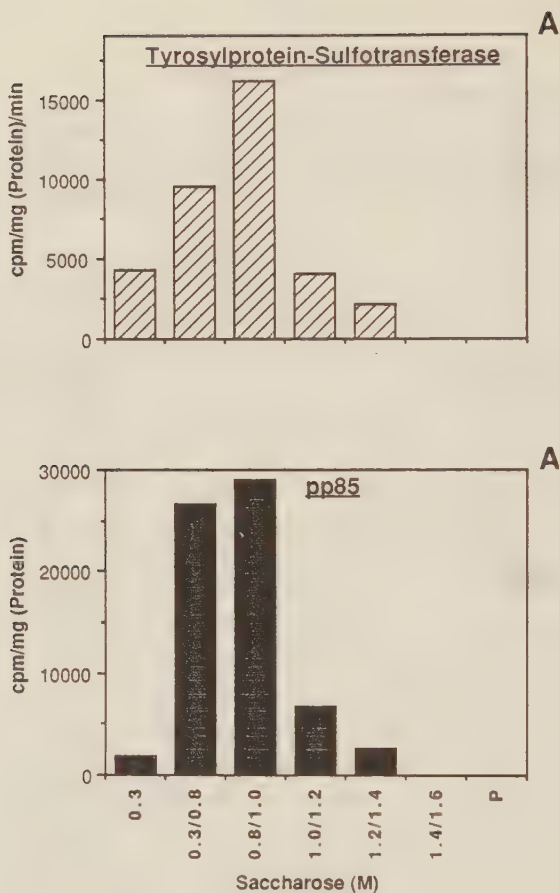
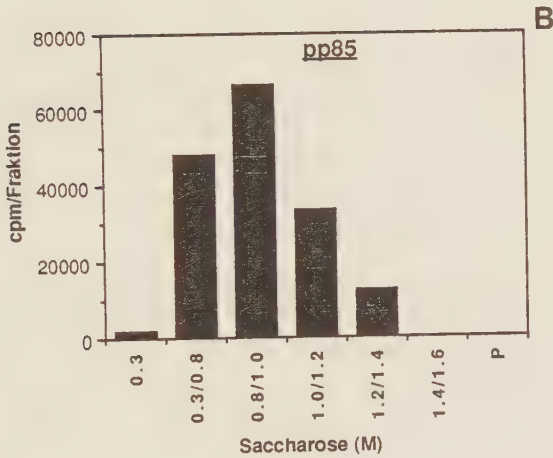
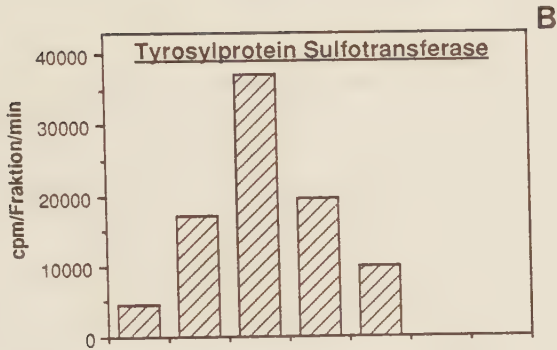


Abbildung 39

Subzelluläre Fraktionierung des Rindernebennierenmarkes. Eine partikuläre Fraktion des Rindernebennierenmarkes wurde durch Zentrifugation auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten subfraktioniert (siehe 3.4.3.). Proben der verschiedenen Fraktionen des Saccharosegradienten mit 10µg Protein wurden mit [3'-³²P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.). In Abweichung zum Standardassay wurden die Proben bei einem pH-Wert von 4.0 inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung des markierten p85 durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zusätzlich wurde noch die Verteilung der Aktivität der Tyrosylprotein-Sulfotransferase in den verschiedenen Fraktionen analysiert (siehe 3.6.1.).



1.) Spezifische Aktivität (A): Die an p85 gebundene Radioaktivität (pp85) in den verschiedenen Fraktionen ist ausgedrückt in cpm pro mg Protein. Die Aktivität der TPST ist wiedergegeben als radioaktiv sulfatiertes Peptid in cpm pro mg Protein und Minute (min).

2.) Gesamtaktivität (B): Die gesamte an p85 gebundene Radioaktivität (pp85) ist wiedergegeben als cpm pro Fraktion, wobei Fraktion definiert ist, als die gesamte Menge an Protein dieser Fraktion. Die TPST-Aktivität ist wiedergegeben, als radioaktiv sulfatiertes Peptid in cpm pro Fraktion und Minute (min).

Für die subzelluläre Fraktionierung wurde, nach der Homogenisation der Rattenleber, eine mikrosomale Fraktion durch differentielle Zentrifugation präpariert (Abbildung 40, Seite 105). Die mikrosomale Fraktion als Lösung in Saccharose (1.22M) wurde mit 3 verschiedenen Saccharoselösungen geringerer Konzentration und Dichte überschichtet (0.25M, 0.86M und 1.15M). Der so entstandene diskontinuierliche Saccharosegradient wurde durch Ultrazentrifugation entwickelt. Proben wurden von den verschiedenen Phasengrenzen und aus den verschiedenen Phasen entnommen. Dabei wurde von der 1.22M Phase nur ca. 2/3 des Volumen entnommen, das restliche Volumen, das über dem Sediment stand, wurde benutzt, um das sedimentierte Material zu resuspendieren. In den verschiedenen Fraktionen wurde die Verteilung von p85 und die Verteilung der Aktivität der Galaktosyltransferase bestimmt. Die Bestimmung der Galaktosyltransferaseaktivität wurde freundlicherweise von Dr. K. Howell durchgeführt. Da die Markierungseffizienz von p85 in Rattenleber schlecht war, wurden die Fraktionen vor der Markierung mit [3'-³²P]PAPS durch Triton X-114 Kondensation und Aceton-Präzipitation an Membranproteinen angereichert.

Wieder wurde das meiste markierte p85 (pro mg Protein) in derselben Fraktion gefunden, in der auch die spezifische Aktivität der Galaktosyltransferase am höchsten war (Abbildung 41,A, Seite 106). Die Verteilung der Gesamtaktivität der Galaktosyltransferase und die größte Menge an markiertem p85 (pro gesamter Fraktion) zeigte zwei Maxima und zwar in der 1.15/1.22M Saccharose Fraktion und in der 1.22M Fraktion. Dabei wird die größte Menge an markiertem p85 im Sediment gefunden, in dieser Fraktion war die Gesamtaktivität der Galaktosyltransferase am zweithöchsten. Die Fraktion, die insgesamt die zweitgrößte Menge an p85 enthielt, war die Fraktion in der die Gesamtaktivität der Galaktosyltransferase am höchsten war (Abbildung 41, B, Seite 107). Anscheinend gab es zwei Populationen von Golgi-Vesikeln. Während die eine aus der Ursprungsfraction aufstieg zu der 1.15/1.22M Phasengrenze, blieb die andere in der Ursprungsfraction (1.22M Phase). Da p85 weitgehend der Verteilung der Galaktosyltransferase folgte, bestätigte die subzelluläre Fraktionierung der Rattenleber die vorhergehende subzelluläre Fraktionierung der Rindernebenniere.

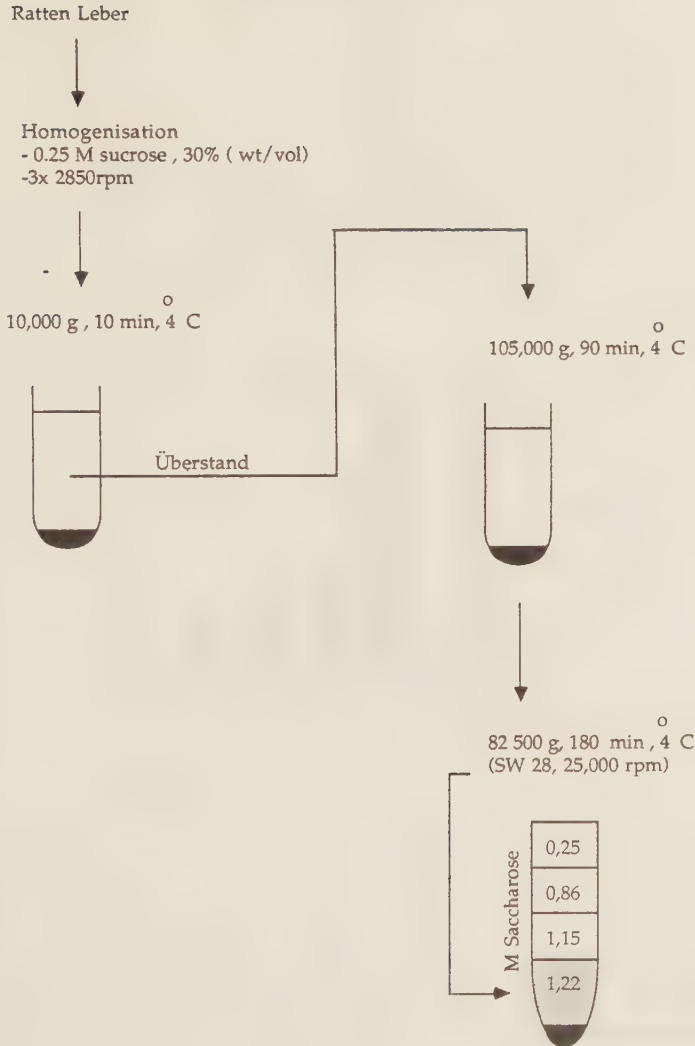


Abbildung 40

Subzelluläre Fraktionierung der Rattenleber.

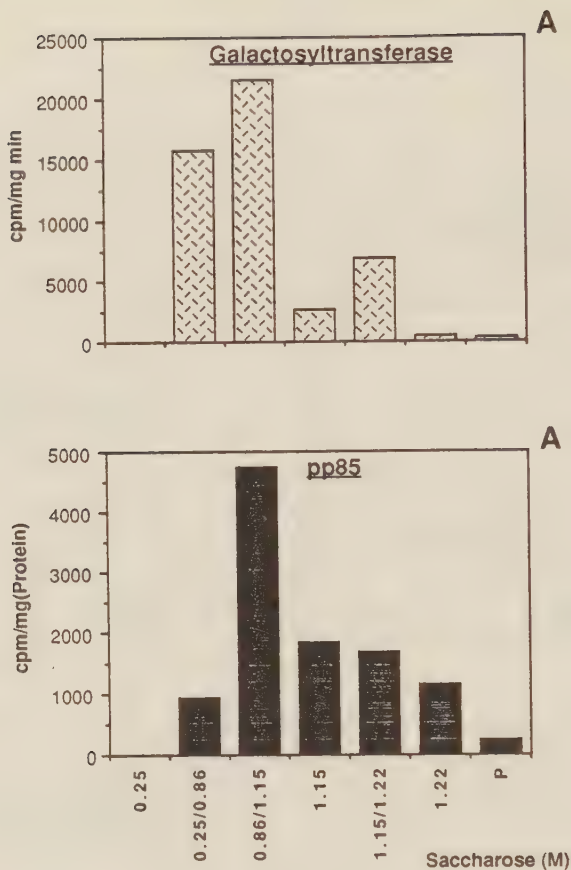
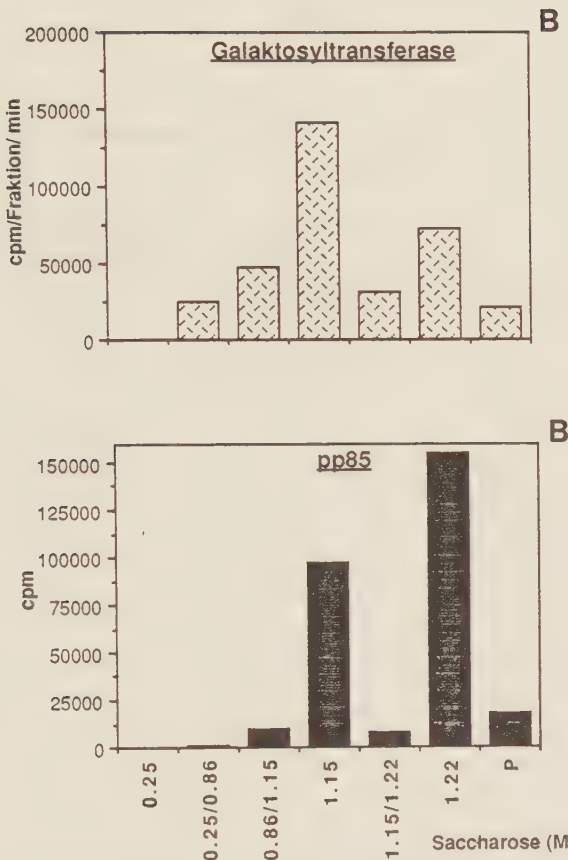


Abbildung 41

Subzelluläre Fraktionierung der Rattenleber. Eine mikrosomale Fraktion der Rattenleber wurde durch Zentrifugation auf einem diskontinuierlichem Saccharosegradienten subfraktioniert (siehe 3.4.4.). Proben der verschiedenen Fraktionen des Saccharosegradientens mit ~195µg Protein wurden durch Triton X-114-Kondensation und anschließende Aceton-Fällung der Detergenzphasen an Membranproteinen konzentriert (siehe 3.4.5.). Die resultierenden Sedimente wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mit [$3'$ - 32 P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.). Die Reaktionen wurden durch Erhitzen in kochendem Wasser beendet. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung des markierten p85 durch Flüssigszintillationszählung analysiert.



Zusätzlich wurde die Verteilung der Aktivität der Galaktosyltransferase in den verschiedenen Fraktionen des Saccharosegradienten bestimmt, dabei wurde Fetuin als Substrat verwendet (siehe 3.6.2.).

1.) Spezifische Aktivität (A): Die an p85 gebundenen Radioaktivität (pp85) in den verschiedenen Fraktionen ist ausgedrückt in cpm pro mg Protein. Die Aktivität der Galaktosyltransferase ist wiedergegeben, als radioaktiv markiertes Fetuin in cpm pro mg Protein und Minute (min).

2.) Gesamtaktivität (B): Die gesamte an p85 gebundene Radioaktivität (pp85) ist wiedergegeben als cpm pro Fraktion, wobei Fraktion definiert ist, als die gesamte Menge an Protein dieser Fraktion. Die Galaktosyltransferase-Aktivität ist wiedergegeben, als radioaktiv markiertes Fetuin in cpm pro Fraktion und Minute (min).

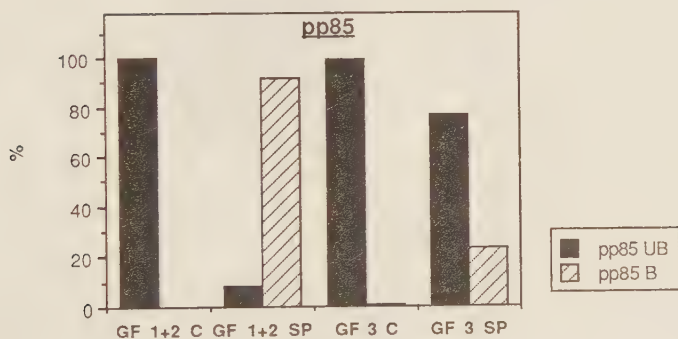
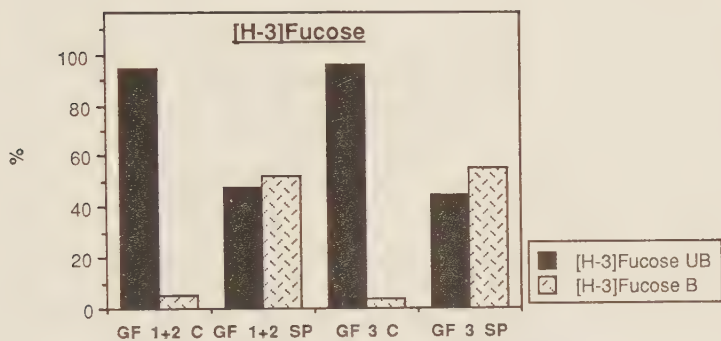
5.4.5. Immunisolierung von p85 mit Antikörpern gegen den polymeren IgA-Rezeptor

Weitere Hinweise auf die subzelluläre Lokalisation von p85 wurde durch Immunisolation von Membranen mit Antikörpern gegen den polymeren IgA-Rezeptor gewonnen. Der polymere IgA-Rezeptor vermittelt in Hepatozyten den Transport von IgA aus dem Blut in den Gallengang. Der polymere IgA-Rezeptor ist ein integrales Membranprotein, welches am Endoplasmatischen Reticulum synthetisiert wird und anschließend durch den Golgi-Komplex zu seinem Bestimmungsort, der zur Ader gerichteten (basolateralen) Membran, transportiert wird. Nach der Bindung von IgA an den Rezeptor wird der Komplex nach Endozytose in Vesikeln zu der apikalen Membran transportiert, die zum Gallengang gerichtet ist. Abschließend wird der Rezeptor in eine lösliche Komponente, die mit dem IgA verbunden in den Gallengang sezerniert wird (sekretorische Komponente) und einen membrangebundenen Rest gespalten, dessen weitere Prozessierung nicht bekannt ist. Daher konnte ein monoklonaler Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil des polymeren IgA-Rezeptors (Solari et al., 1985) verwendet werden, um in Immunadsorptionsexperimenten Vesikel des sekretorischen und transzytotischen Transportweges zu isolieren. Dabei wurde als Immunadsorbens Sephadex-Kügelchen verwendet, an die ein IgG-Antikörper gegen den FC-Teil von Mausantikörpern kovalent gebunden war. Diese Kügelchen wurden mit einem monoklonalen Maus-IgG gegen den zytoplasmatischen Teil des polymeren IgA-Rezeptors inkubiert. Die Inkubation wurde über Nacht auf Eis durchgeführt (Howell und Ansorge, 1988). Als Kontrolle wurden Kügelchen verwendet, an die Rinderserumalbumin kovalent gebunden war. Für die Fraktionierungsexperimente wurden die subzellulären Fraktionen der Rattenleber verwendet, die die höchste spezifische Aktivität an Galaktosyltransferase aufwiesen, und zwar die Fraktion von der 0.25/0.86M und von der 0.86/1.15M Saccharosephasengrenze. Als weiteren Parameter enthielten die Fraktionen, die für das Experiment verwendet wurden, [^3H]Fucose, das den Ratten 5 Minuten vor der Entnahme der Leber intravenös gespritzt worden war. Unter diesen Bedingungen wird die radioaktive [^3H]Fucose von den Zellen aufgenommen und im Golgi-Apparat in lösliche und an die Membran gebundene Glykoproteine eingebaut. Da die Zeit so gewählt war, daß die meisten Glykoproteine den Golgi-Komplex noch nicht verlassen hatten, konnte die Verteilung von an Proteinen gebundener [^3H]Fucose in den verschiedenen

Fraktionen dazu benutzt werden, um Golgi angereicherte Fraktionen zu erkennen (Sztul et al., 1983, 1985). Dabei kann die Bindung von [^3H]Fucose an Proteine durch Trichloressigsäure-Präzipitation nachgewiesen werden, wobei ungebundene [^3H]Fucose nicht gefällt wird. Zur Vereinfachung wird von jetzt ab an Proteine gebundene, Trichloressigsäure-präzipitierbare [^3H]Fucose als [^3H]Fucose bezeichnet. Die Fraktionen wurden entweder mit den Kügelchen, die den spezifischen Antikörper trugen oder mit den Kontrollkügelchen, die Rinderserumalbumin trugen, für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kügelchen durch Zentrifugation abgetrennt. Die resultierenden Überstände, die nicht gebundene Proteine und Membranen enthielten, wurden mit Triton X-114 versetzt und einer Triton X-114 Kondensation unterzogen. An die Kügelchen gebundene Membranvesikel wurden durch Triton X-114 gelöst und durch Zentrifugation von den Kügelchen getrennt. Anschließend wurde der resultierende Überstand einer Triton X-114-Kondensation unterzogen. Abschließend wurden die verschiedenen Detergenzphasen mit [$3'\text{-}^{32}\text{P}$]PAPS inkubiert. Die Analyse der Proben zeigte, daß p85 nur dann in den Fraktionen, die aus dem an die Kügelchen gebundenem Material entstanden waren, nachgewiesen werden konnte, wenn die Kügelchen den spezifischen Antikörper gegen den polymeren IgA-Rezeptor getragen hatten. Die Kontrollkügelchen mit Rinderserumalbumin banden keine Membranen, die markierbares p85 enthielten. In keinem Fall wurde p85 vollständig aus dem Überstand entfernt (Abbildung 42, Seite 111). Die Verteilung von [^3H]Fucose in den verschiedenen Fraktionen nach der Immunisolation zeigte dasselbe Verhalten wie p85. Vesikel, die an Proteine gebundene [^3H]Fucose enthielten, banden nur dann an die Kügelchen, wenn diese Antikörper gegen den polymeren IgA-Rezeptor trugen. Auch [^3H]Fucose konnte wie markiertes p85 nicht vollständig von den Kügelchen gebunden werden. Jedoch ist die Verteilung von [^3H]Fucose und markiertem p85 in den Fraktionen unterschiedlich. Somit befand sich markierbares p85 wie der polymere IgA-Rezeptor in Membranen des sekretorischen oder transzytotischen Transportweges. Wegen der unterschiedlichen Verteilung des markierten p85 und der [^3H]Fucose konnte in diesem Experiment das subzelluläre Kompartiment, welches p85 enthält, nicht weiter eingegrenzt werden.

Abbildung 42

Immunisolierung von p85 aus subzellulären Fraktionen der Rattenleber. Für die Immunisolierung von p85 aus Rattenleber wurden die beiden Fraktionen mit der höchsten Galaktosyltransferaseaktivität (0.25/0.86M Interphase (GF1+2); 0.86/1.15M Interphase (GF3)) verwendet. Diese wurden mit Kügelchen inkubiert, die entweder einen spezifischen IgG-Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil des polymeren IgA Rezeptors (SP) oder Rinderserumalbumin (C) trugen. Nach der Inkubation (2 Stunden bei 4°C) wurden die Kügelchen durch Zentrifugation abgetrennt. Der resultierende Überstand wurde mit Triton X-114 versetzt. Das resultierende Sediment wurde in dem selben Volumen eines Triton X-114-haltigen Puffers gelöst wie der Überstand und danach die Kügelchen durch erneute Zentrifugation abgetrennt. Insgesamt ergaben sich pro eingesetzter Fraktion vier Subfraktionen: Membranfraktionen, die entweder an Kügelchen mit dem spezifischen Antikörper (B GF1+2 SP, B GF3 SP) oder an Kügelchen mit Rinderserumalbumin banden (B GF1+2 C, B GF3 C), sowie Membranfraktionen die entweder nicht an Kügelchen mit dem spezifischen Antikörper (UB GF1+2 SP, UB GF3 SP) oder die nicht an Kügelchen mit Rinderserumalbumin banden (UB GF1+2 C, UB GF3 C). Die Triton X-114 haltigen Lösungen wurden durch Triton X-114-Kondensation weiter fraktioniert. Gleiche Volumina der resultierenden Detergenzphasen wurden mit [3'-³²P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.). Abweichend vom Standardassay wurden die Proben bei einem pH-Wert von 4.0 inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Da die an p85 gebundene Radioaktivität zu gering war, um sie durch Flüssigszintillationszählung zu quantifizieren, wurde das Autoradiogramm direkt zur Quantifizierung benutzt. Dazu wurde das Autoradiogramm mit 1.0N NaOH eine Stunde lang bei Raumtemperatur behandelt und die Menge an eluiertem Silber photometrisch (OD_{500nm}) bestimmt (Suissa, 1983). Zusätzlich ist die Verteilung von an Proteinen gebundener [³H]Fucose in den einzelnen Fraktionen dargestellt. In beiden Fällen wird die Verteilung von radioaktiv markiertem p85 (pp85) und [³H]Fucose in den Fraktionen in Prozent angegeben, wobei die Summe aus gebundenem und nichtgebundenem Material 100% ist.



5.4.6. Orientierung von p85 in der Membran

Um die Frage zu beantworten, ob p85 auf der luminalen oder auf der zytoplasmatischen Seite der Vesikelmembran PAPS bindet, wurde versucht die Bindungsstelle durch Proteasen zu zerstören, um damit die Phosphorylierung von p85 unmöglich machen. Sollte die Bindungsstelle für PAPS zum Zytoplasma gerichtet sein, wäre die Zerstörung unabhängig vom Detergenz, bei einer luminalen Orientierung wäre die Zerstörung hingegen nur in Gegenwart von Detergenz möglich. Deshalb wurde das 20K-Sediment mit verschiedenen Proteasen in der An- oder Abwesenheit von 1% Triton X-100 oder 0.1% SDS inkubiert. Als Proteasen wurden Trypsin, Chymotrypsin oder Pronase benutzt. Anschließend wurden die Proben mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert, um p85, wenn möglich, zu markieren (Abbildung 43, Seite 113 und 114). Unter keiner dieser Bedingungen wurde p85 von einer der benutzten Proteasen angegriffen. Weder die Markierungseffizienz noch das Molekulargewicht von p85 änderten sich, selbst dann nicht, wenn die Fraktionen mit 0.1% SDS versetzt worden waren. Erst nach neunzigminütiger Inkubation von p85 in 0.1% SDS mit Pronase wurde die Markierungsfähigkeit langsam zerstört (Daten nicht gezeigt). Die entsprechenden Gele, mit Coomassie Blau gefärbt, zeigten deutlich, daß die Proteasen aktiv waren.

Konnte die Orientierung der Bindungsstelle für PAPS von p85 auch nicht durch Proteaseverdau gezeigt werden, legten doch die Versuche zur Geschwindigkeit der Phosphorylierung von p85 nahe, daß die Bindungsstelle relativ frei zugänglich war. So erfolgte die Markierung von p85 nicht nur sehr schnell, sondern war auch unabhängig von Detergenz. Sowohl mit, als auch ohne zugesetztes Triton X-100, wurde das Maximum an phosphoryliertem p85 nach nur 2 Sekunden Inkubation mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ erreicht (Abbildung 44, Seite 115). Dies kann als Hinweis auf eine zytoplasmatische Orientierung der PAPS-Bindungsstelle gewertet werden.

Ein weiterer Hinweis auf die Orientierung der Bindungsstelle ergab sich durch Versuche mit Inhibitoren der PAPS-Translokation im Golgi-Komplex. DIDS, ATR und Palmitoyl-CoA konnten die Translokation von PAPS in das Lumen der Golgi-Vesikel inhibieren (Capasso et al., 1984, b). Da wahrscheinlich ein Teil von p85 im Golgi-Komplex lokalisiert ist, erschien es sinnvoll zu überprüfen, ob die radioaktive Markierung von p85 durch die genannten



Abbildung 43

Behandlung von p85 mit verschiedenen Proteasen in der An- und Abwesenheit von Detergenzien. 100 μg des Proteins des 20K-Sedimentes (siehe 3.4.2.) wurden mit Trypsin, Chymotrypsin oder Pronase in An- oder Abwesenheit von 1% SDS oder 0.1% Triton X-100 45 Minuten lang bei 30°C inkubiert. Das Verhältnis der Proteasen zu Protein war: Trypsin 1:10, Chymotrypsin 1:40, Pronase 1:40. Der benutzte Puffer bestand aus 50mM Tris/HCl pH 7.0. Die Kontrollproben wurden mit demselben Volumen Puffer anstelle von Protease versetzt. Nach Beendigung der Proteasebehandlung wurden die Proben mit $[3^{\text{H}}\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Abweichend vom Standardassay wurden die Proben bei einem pH-Wert von 8.0 inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Photographien der mit Coomassie-Blau gefärbten Gele (A) und die entsprechenden Autoradiogramme (B) sind abgebildet.

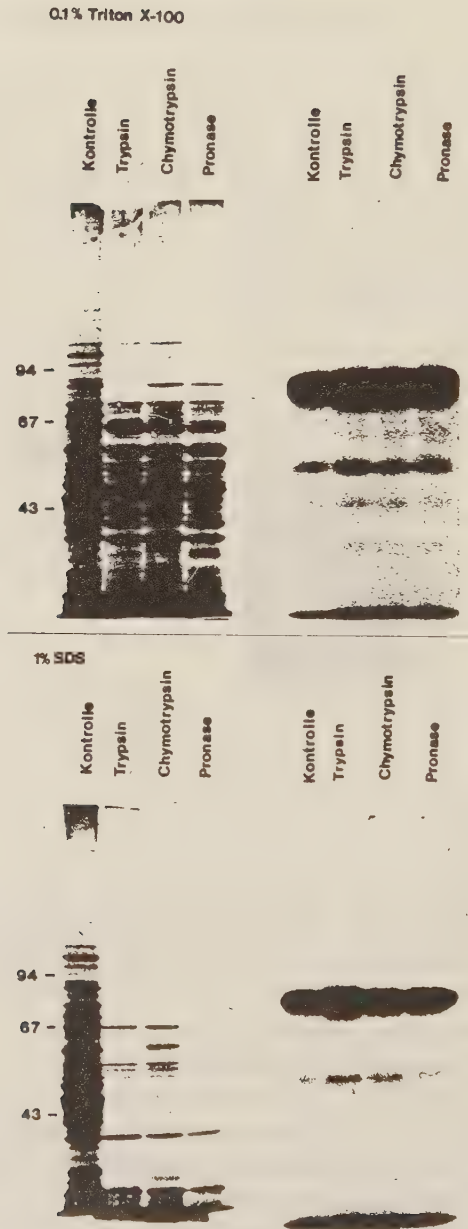


Abbildung 43

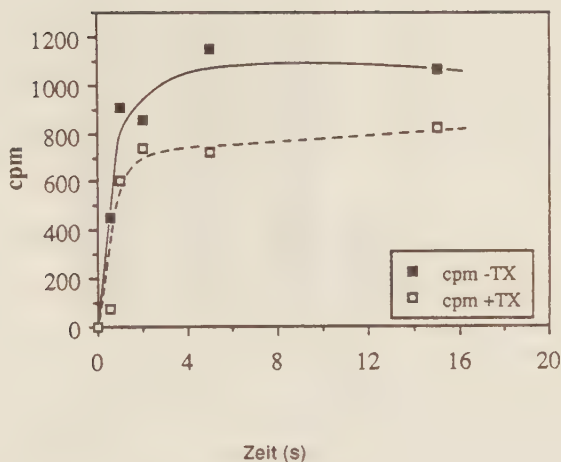


Abbildung 44

Zeitverlauf der Phosphorylierung von p85. 50 μ g des Proteins der 0.5/1.5M Interphase (siehe 3.4.2.) wurden mit [3'- 32 P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.). Die Reaktionslösung enthielt entweder kein Triton X-100 oder 1% Triton X-100 (Endkonzentration). In Abweichung zum Standardassay wurden die Proben für 0, 1, 2, 5 oder 15 Sekunden inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogrammes auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Der abgebildete Graph beruht auf diesen Werten.

Transportinhibitoren beeinflusst wurde. Deshalb wurden mikrosomale Fraktionen der Rindernebenniere mit [3'-³²P]PAPS in Gegenwart der Transportinhibitoren inkubiert (Abbildung 45, Seite 117). Die Konzentration der Transportinhibitoren war so gewählt, daß sie die Translokation von PAPS wirksam inhibierten (Capasso und Hirschberg, 1984). Die Markierungseffizienz wurde nur durch die Gegenwart von Palmitoyl-CoA verringert, nicht jedoch durch die anderen Transportinhibitoren. Da Palmitoyl-CoA eine 3'-Phosphatgruppe am Ribosering trägt, konkurriert es wahrscheinlich direkt mit PAPS um die Bindung an p85. Somit unterstützt auch dieses Experiment die Ergebnisse des Zeitverlaufes der Reaktion, die eine Bindungsstelle für PAPS von p85 auf der zytoplasmatischen Seite der Golgi-Membran wahrscheinlich machten.

5.4.7. p85 ist ein weitverbreitetes Protein

Die Charakterisierung von p85 wurde weitgehend mit mikrosomalen Fraktionen der Rindernebenniere durchgeführt. Außerdem konnte p85 in der Rattenleber und -niere nachgewiesen werden. Die Frage, ob p85 ein ubiquitäres oder ein für einen bestimmten Zelltyp, spezifisches Protein ist, wurde durch Inkubation verschiedener Rattengewebe und klonaler Zelllinien mit [3'-³²P]PAPS beantwortet. Dazu wurden einer Ratte verschiedene Organe entnommen und aus diesen durch differentielle Zentrifugation mikrosomale Fraktionen präpariert. Diese mikrosomalen Fraktionen wurden durch Triton X-114 Kondensation weiter aufgereinigt. Die resultierenden Detergenzphasen wurden mit [3'-³²P]PAPS inkubiert. In jedem Fall war ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 85kDa in den verschiedenen Fraktionen die am stärksten markierte Bande (Abbildung 46, Seite 118). Nur in den Fraktionen des Rattenhirns und der Rattenmilz wurden zwei Proteine in dem Molekulargewichtsbereich von 85kDa markiert. Weitere Membranproteine wurden nicht markiert, auch wenn für 30 Minuten UV-Licht eingestrahlt wurde.

Außerdem wurden Detergenzphasen verschiedener klonaler Zelllinien, die durch Triton X-114 Kondensation von partikulären Fraktionen erhalten wurden, auf die Anwesenheit von p85 untersucht. Dabei waren die Zelllinien so gewählt, daß möglichst große Unterschiede in Bezug auf Zelltyp, Spezies und Entwicklungszustand bestanden (Abbildung 47, Seite 119).

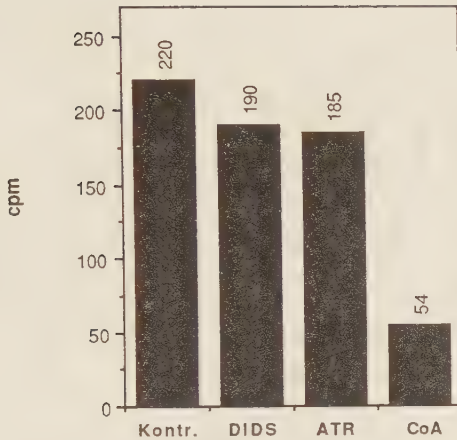


Abbildung 45

Einfluß verschiedener Transportinhibitoren auf die Markierung von p85. 60µg der 0.5/1.5M-Interphase (siehe 3.4.2.) wurden mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Dabei wurden der Reaktionsmischung DIDS (DIDS), Atractylosid (ATR), oder Palmitoyl-CoA (CoA) mit einer Endkonzentration von 100mM zugesetzt. Der Kontrollprobe (Kontr.) wurde Wasser zugesetzt. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie und Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Zu diesem Zweck wurde p85 mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstücke in einem Szintillationscocktail gezählt. Die Abbildung basiert auf diesen Werten .

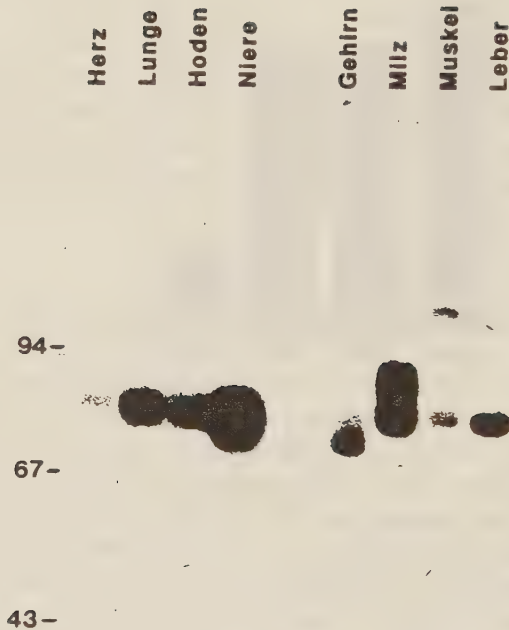


Abbildung 46

Markierung verschiedener Rattengewebe mit $[3':^{32}\text{P}]\text{PAPS}$. 2mg des Proteins des 100,000g Sedimentes verschiedener Rattengewebe (siehe 3.4.1.) wurde durch Triton X-114-Kondensation (siehe 3.4.5., Volumen der Lösung, 1ml) weiter fraktioniert. 55 μg des Proteins der resultierenden an Membranproteinen angereicherten Detergenzphasen wurde mit $[3':^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert. (siehe 3.5.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet. Autoradiogramm A wurde 1 Stunde lang ohne Verstärkung exponiert, Autoradiogramm B wurde über Nacht mit Verstärkung exponiert.

Zelllinie	Zelltyp	Literatur
N5	menschliche Hautfibroblasten	Grinnell, Feld, 1979
Hybridom (monoklonaler Antikörper gegen Sekretogranin 1)	Hybrid aus Myelomzelle und Mausmilzzelle	Rosa et al., unveröffentlichte Ergebnisse
AtT 20	Adrenocorticotrophe Maushypophysenzellen	Mains et al., 1977
HepG2	menschliche Hepatomzellen	Knowels et al., 1980
F9	embryonale Mauskarzinomzellen	Bernstine et al., 1972
PC 12	chromaffine Zellen des Nebennierenmarkes der Ratte	Greene, Rein, 1977
BHK	Nierenfibroblasten des syrischen Hamsters	Freedman, Shin, 1974

Abbildung 47

Herkunft und Zelltyp der Zelllinien, die auf den Gehalt an markierbarem p85 untersucht wurden.

Die Inkubation der verschiedenen Detergenzphasen mit [3'-³²P]PAPS führte in allen Fällen zu der Markierung eines Proteins im Molekulargewichtsbereich von 85kDa, andere Proteine wurden nicht markiert (Abbildung 48, Seite 121).

Waren die markierten Proteine, die in den Detergenzphasen der verschiedenen Rattengewebe und klonalen Zelllinien durch [3'-³²P]PAPS markiert wurden, mit markiertem p85 aus der Rindernebenniere verwandt oder identisch? Um diese Frage zu beantworten, wurden die markierten Banden der verschiedenen Rattengewebe und klonalen Zelllinien einer limitierten Proteolyse unterworfen (Cleveland et al., 1977). Das Ergebnis der Proteolyse wurde durch Autoradiographie analysiert (Abbildung 49, 50, Seite 122 und 123). Zur Vereinfachung werden -von jetzt ab- die markierten Banden, bzw. die zu ihnen gehörenden Peptide, nach dem Gewebe oder der Zelllinie, von denen sie stammen, bezeichnet. Es wurden maximal 6 Peptide beobachtet, die, wenn nicht anders erwähnt, gleiches Molekulargewicht besaßen. Das am wenigsten verdaute Peptid 6 ist aller Wahrscheinlichkeit nach unverdautes p85. Die am stärksten verdauten Peptide 1 und 2 wurden in allen getesteten Fraktionen gefunden. Jedoch war Peptid 1 in der N5-Zelllinie zu einem höheren scheinbaren Molekulargewicht verschoben. Peptid 4 wurde in allen getesteten Rattengewebe und der Rindernebenniere gefunden. Jedoch variierte das Molekulargewicht von Peptid 4 der beiden markierten Proteine der Rattenmilz und des Rattenhirns. Dabei wies Peptid 4 der oberen Bande ein größeres Molekulargewicht auf als das Peptid der unteren Bande. Außerdem wurde Peptid 4 in den meisten getesteten Zelllinien gefunden, die AtT 20- und die BHK Zelllinie ausgenommen. Peptid 5 wurde in allen getesteten Geweben mit Ausnahme von Rattenherz gefunden. In der Rindernebenniere ist es nur sehr schwach zu erkennen. Jedoch konnte es nur in der Hybridom- und F9-Zelllinie gefunden werden, in den anderen getesteten Zelllinien konnte es nicht nachgewiesen werden. Peptid 3 scheint spezifisch für Rattenmilz, die AtT20-, die PC-12- und die BHK-Zelllinie zu sein. Das Molekulargewicht von Peptid 3 ist variabel, in den meisten Fällen erscheint es über einen breiten Molekulargewichtsbereich verschmiert und nicht als eine diskrete Bande. Außerdem wurde in der N5-Zelllinie noch ein Peptid zwischen Peptid 1 und 2 beobachtet. Trotz der beobachteten Unterschiede sind die durch den Verdau entstandenen Bandenmuster der verschiedenen Rattengewebe und klonalen Zelllinien sehr ähnlich zu dem Bandenmuster von p85 aus der Rindernebenniere.

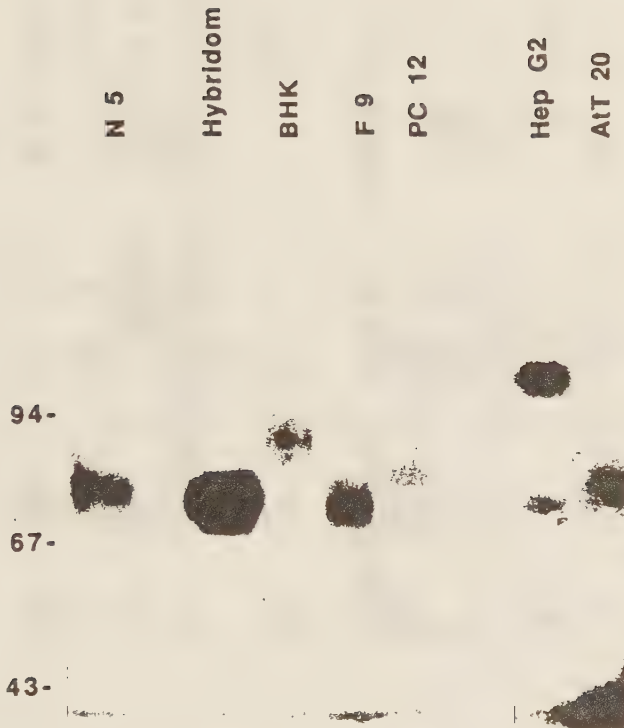


Abbildung 48

Markierung verschiedener Zelllinien mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$. 100,000g Sediment verschiedener Zelllinien (siehe 3.4.1.) wurde durch Triton X-114-Kondensation (siehe 3.4.5., Volumen der Lösung: 1ml) weiter fraktioniert. 70 μg des Proteins der resultierenden, an Membranproteinen angereicherten Detergenzphasen wurde mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet. Das linke Autoradiogramm (N5 -PC-12) wurde kürzer exponiert als das rechte Autoradiogramm (HepG2, AtT 20).

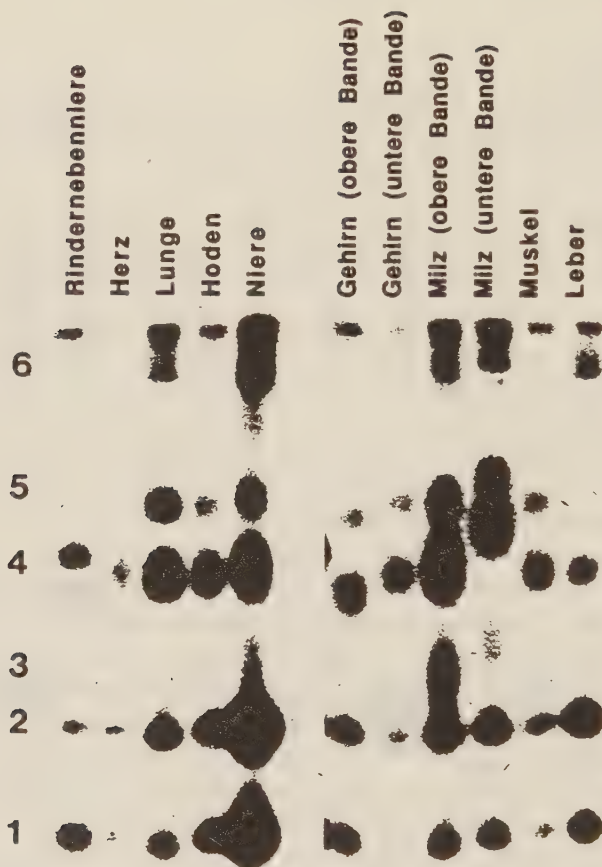


Abbildung 49

Limitierter proteolytischer Verdau von mit $[3\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markierten Proteinen verschiedener Rattengewebe. Die in Abbildung 46, Seite 113, gezeigten Autoradiogramme wurden benutzt, um markierte Proteine im Molekulargewichtsbereich von 85kDa auf den Gelen zu lokalisieren und auszuschneiden. Nach Quantifizierung der an diese Proteine gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung wurden die Gelstücke limitierter Proteolyse unterworfen (siehe 3.3.6.). p85 der Rindernebenniere wurde als Standard benutzt. Die resultierenden Gele wurden durch Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet. Autoradiogramm A wurde kürzer exponiert als Autoradiogramm B. Die radioaktiven Peptide sind willkürlich nach ihrem Molekulargewicht in aufsteigender Folge numeriert. Die Bande oberhalb von Peptid 6 ist die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel.

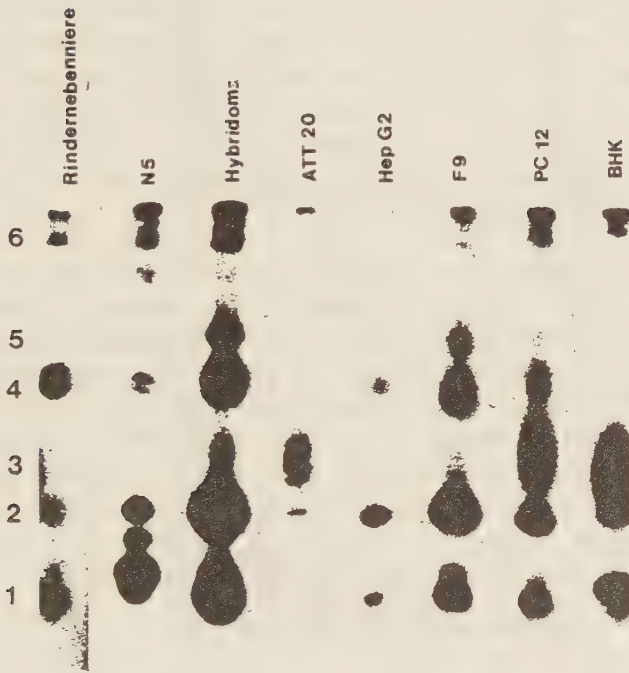


Abbildung 50

Limitierte Proteolyse von mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markierten, Proteinen verschiedener klonaler Zelllinien. Die in Abbildung 48, Seite 121, gezeigten Autoradiogramme wurden benutzt um markierte Proteine im Molekulargewichtsbereich von 85kDa auf den Gelen zu lokalisieren und auszuschneiden. Nach Quantifizierung der an diese Proteine gebundenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung wurden die Gelstücke limitierter Proteolyse unterworfen (siehe 3.3.6.). p85 der Rindernebenniere wurde als Standard benutzt. Die resultierenden Gele wurden durch Autoradiographie analysiert. Die Autoradiogramme sind abgebildet. Die radioaktiven Peptide sind willkürlich nach ihrem Molekulargewicht in aufsteigender Folge numeriert. Die Bande oberhalb von Peptid 6 ist die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel.

Vor allem die am stärksten verdauten Peptide 1 und 2 können als charakteristische Peptide für p85 gelten. Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß die markierte Bande im Molekulargewichtsbereich von 85kDa, die in den verschiedenen klonalen Zelllinien und Rattengeweben beobachtet wurde, tatsächlich mit p85 der Rindernebenniere identisch ist. Sogar die bei der Markierung von Rattenmilz und Rattenhirn beobachteten Doppelbanden, scheinen verschiedene Formen eines Proteins zu sein. p85 ist demnach ein weit verbreitetes Protein.

Die Unterschiede, die in dem Verhältnis zwischen den einzelnen Peptiden, in den verschiedenen Fraktionen beobachtet wurden, können als Hinweise auf unterschiedliche Konzentrationen von p85 in den betreffenden Rattengeweben und klonalen Zelllinien gewertet werden. Die Unterschiede in dem scheinbaren Molekulargewicht der Peptide, vor allem 3, 4 und 5 kann durch unterschiedliche Modifikation von p85 in den verschiedenen Geweben und Zelllinien hervorgerufen worden sein. Diese Idee wird unterstützt durch die Tatsache, daß p85 ein Glykoprotein mit komplexen Kohlenhydratstrukturen ist (siehe Neuraminidase-Verdau von p85) und daß Isoformen von p85 nach zweidimensionaler Elektrophorese beobachtet wurden (Abbildung 24, Seite 72).

5.4.8. Menge an phosphoryliertem p85 in den getesteten Rattengeweben und klonalen Zelllinien

Die von p85 gebundene Radioaktivität in den verschiedenen Ratten-, Rindergeweben und Zelllinien wurde durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert (Abbildung 51, Seite 125). Da die Markierungsexperimente der beiden Gewebe und der Zelllinien nicht zu derselben Zeit durchgeführt wurden, war eine direkte Korrelation der Werte nicht möglich. Aus diesem Grund ist die von p85 gebundene Radioaktivität in Prozent der Radioaktivität ausgedrückt, die von dem am stärksten markierten Gewebe oder der am stärksten markierten Zelllinie in dem jeweiligen Experiment gebunden wurde. Es zeigte sich, daß die von p85 gebundene Radioaktivität in den verschiedenen Geweben und Zelllinien sehr stark variierte. Am extremsten drückte sich der Unterschied im Vergleich der verschiedenen Rattengewebe aus. Die Fraktion der Rattenniere band 300mal mehr Radioaktivität als die Fraktion des Rattenmuskels.

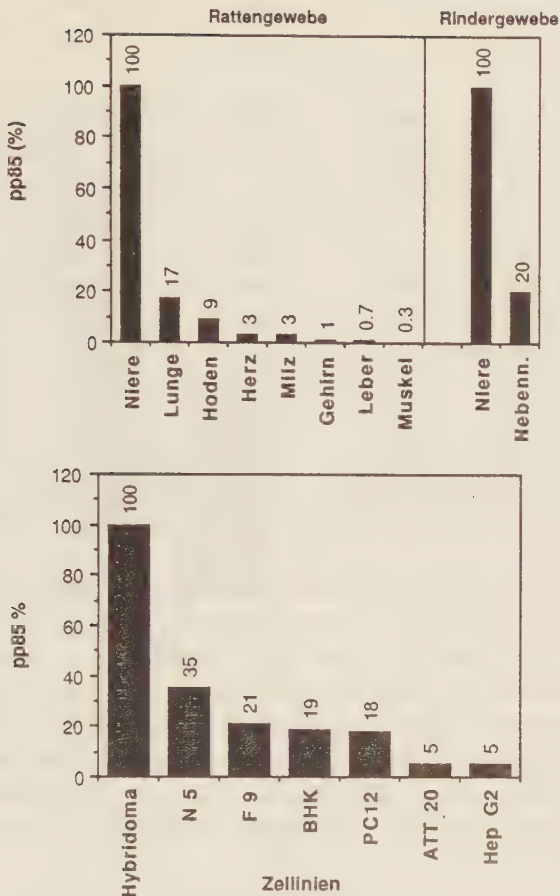


Abbildung 51

Quantifizierung der an p85 gebundenen Radioaktivität in verschiedenen Rattengeweben, Rindergeweben und klonalen Zelllinien. Gelstücke, die markiertes p85 verschiedener Rattengewebe, Rindergewebe und klonaler Zelllinien enthielten, wurden durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert. Die Gelstücke der Rattengewebe und Zelllinien stammten aus den oben beschriebenen Experimenten (siehe 5.4.7.), bei denen Detergenzphasen nach Triton X-114-Kondensation von mikrosomalen Fraktionen mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert wurden. Die Gelstücke der Rindergewebe stammen von Markierungsexperimenten mit $30\mu\text{g}$ des 20K-Sedimentes (siehe 3.4.2.) der Rinderniere und Rindernebeniere.

Nicht ganz so groß waren die beobachteten Unterschiede zwischen den getesteten Rindergeweben und Zelllinien. Rinderniere band 5mal so viel Radioaktivität wie Rindernebenniere und die Hybridom-Zelllinie 20mal so viel Radioaktivität wie die HepG2 Zelllinie. Eine Korrelation zwischen der Markierungseffizienz von p85 der Gewebe und der Zelllinien konnte nicht festgestellt werden. So waren trotz hoher Markierungseffizienz von p85 in Rattenniere BHK-Zellen nicht die am stärksten markierte Zelllinie. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß Fibroblasten nicht die Zellen sind, die für die große Menge an phosphoryliertem p85 in der Niere verantwortlich sind. Ob die starken Unterschiede an gebundener Radioaktivität auf unterschiedliche Mengen an p85, unterschiedliche Markierungseffizienz von p85 oder einer Kombination beider Faktoren zurückzuführen ist konnte von diesem Experiment nicht geklärt werden. Die Möglichkeit, daß ein Inhibitor, der die Markierungseffizienz von p85 ändert, für die starken Markierungsunterschiede verantwortlich ist, wurde durch ein Mischungsexperiment ausgeschlossen. Dazu wurden Detergenzphasen der Rattenniere und der Rattenleber, die in dem vorhergehenden Experiment benutzt worden waren, gemischt und mit [3'-³²P]PAPS inkubiert. Die Analyse der Proben zeigte, daß die Mischung aus gleichen Mengen an Protein von Rattenniere und Rattenleber nur etwa halb so effizient markiert wurde, wie eine Probe, die nur aus der Detergenzphase der Rattenniere bestand (Abbildung 52, Seite 127). Die Proteinkonzentration und das Volumen waren bei unvermischten Proben und gemischten Proben identisch.

5.5. Versuche zur Aufreinigung von p85

Es wurde zunächst versucht, mit den bereits etablierten analytischen Methoden eine partielle Aufreinigung von p85 zu erzielen. Das partiell aufgereinigte p85 sollte, durch Injektion in Mäuse die Produktion von monoklonalen Antikörpern ermöglichen. Anschließend sollten die monoklonalen Antikörper für die Aufreinigung von p85 verwendet werden.

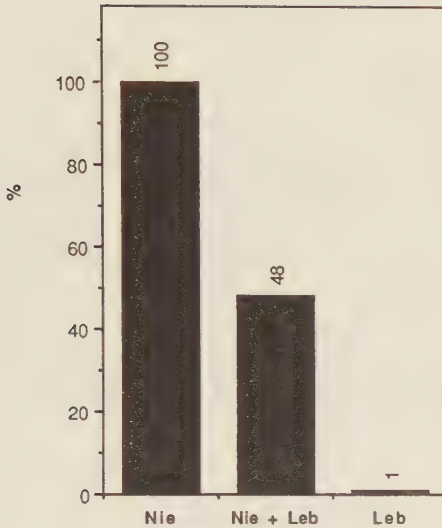


Abbildung 52

Mischung der Detergenzphasen von Rattenniere und Rattenleber. Die Detergenzphasen der Rattenniere und Rattenleber, sowie die Reaktionsbedingungen waren exakt dieselben wie sie für die in Abbildung 46, Seite 113, beschriebenen Experimente verwendet wurden. 100µg des Proteins der Rattenniere (Nie), 50µg des Proteins der Rattenniere und 50µg des Proteins der Rattenleber (1:1) (Nie+Leb) und 100µg des Proteins der Rattenleber (Leb) wurden mit $[3\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert (siehe 3.5.). Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert. Markiertes p85 wurde durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert. Die Menge an Radioaktivität ist wiedergegeben in Prozent der Menge, die von p85 in Rattenniere gebunden wurde.

5.5.1. Partielle Aufreinigung von p85

Die ersten Schritte der Aufreinigung, nämlich die der differentiellen Zentrifugation, sind identisch mit den Zentrifugationsschritten, welche zur Darstellung des 20,000g Sedimentes angewendet wurden (siehe 3.4.2.). Das Sediment, das nach der Zentrifugation bei 20,000g anfiel, wurde in 0.3M Saccharose resuspendiert und der Natriumkarbonatbehandlung unterzogen. Die resultierende, nicht in Natriumkarbonat lösliche, Membranfraktion wurde nach der Zentrifugation in 10mM HEPES, pH 7.3 und 0.5%SDS aufgenommen. Ausgehend von 212g Rindernebenniere konnten 1g der Membranfraktion nach Natriumkarbonatbehandlung gewonnen werden (Abbildung 53, Seite 129).

Abbildung 53

Aufreinigung von p85. Rindernebennieren wurden homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation, mit 800g und 20,000g, wurde ein 20K Sediment präpariert (siehe 3.4.2). Anschließend wurde das 20K Sediment durch Natriumkarbonatbehandlung weiter fraktioniert (siehe 3.4.5.). Das resultierende Natriumkarbonatsediment, welches an Membranproteinen angereichert war, wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese weiterfraktioniert. Um p85 zu markieren war zuvor ein Aliquot mit $[3\text{'-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ inkubiert worden und danach zu der restlichen Probe wieder zugegeben worden. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine des p85-haltigen Teiles des Gels elektroeluiert (siehe 3.3.5.). Das Elektroeluat wurde durch zweidimensionale Gelelektrophorese (siehe 3.3.3.) aufgetrennt. Die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Fraktionen wurde nach Peterson bestimmt (1977, siehe 3.3.1.). Die spezifische Aktivität von p85 wurde als die an p85 gebundene Menge an Radioaktivität pro mg Protein definiert und für das Homogenat willkürlich gleich eins gesetzt. Die Ausbeute an radioaktiv markierten p85 bezieht sich auf die Menge an p85 die im gesamten Homogenat markiert wurde und wurde für diese Fraktion mit 100% festgelegt. Vom Natriumkarbonatsediment ab ist in Klammern die Ausbeute an radioaktiv markiertem p85 angegeben, die sich ergibt, wenn die Ausbeute für das Natriumkarbonatsediment mit 100% festgelegt wird.

Fraktion	Protein (g)	spezifische Aktivität	Ausbeute an radioaktiv markiertem p85 (%)
Rinderneben- nieren	212	n.b.	n.b.
Homogenat	12	1	100
20K Sediment	3	3	70
Na ₂ CO ₃ Sediment	1	20	175

Na ₂ CO ₃ Sediment	84	20	175 (100)
90 - 80 kDa Proteine (nach Elektroelution)	1.4	949	133 (76)
aufgereinigtes p85 (nach 2D- Elektrophorese)	n.b.	n.b.	51 (29)

Die Markierung von p85 durch [3'-³²P]PAPS (pro mg Protein), von nun an vereinfacht als spezifische Aktivität von p85 bezeichnet, war in der Membranfraktion 20 mal höher als im Homogenat. Dieser Anstieg der spezifischen Aktivität ist stärker, als nach der Proteinbilanz zu erwarten gewesen wäre, wie die Bilanzierung der Gesamtausbeute ausweist.

Die Membranfraktion wurde nur in kleinen Mengen von etwa 84mg pro Ansatz weiterverarbeitet. Um p85 nach der Gelelektrophorese aufspüren zu können, wurde eine kleine Menge der Membranfraktion mit [3'-³²P]PAPS markiert und dem Rest der Fraktion vor der Elektrophorese wieder zugesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele, unfixiert und ungefärbt, getrocknet und anschließend autoradiographiert. Das Autoradiogramm wurde benutzt, um die 85 kDa Region aus dem Gel zu schneiden. Die Proteine wurden durch Elektroelution aus dem Gel entfernt.

In Vorversuchen waren die Bedingungen für die Elektroelution bestimmt worden. Nach 12 Stunden bei 150V konstanter Spannung war die Elution nahezu vollständig (Abbildung 54, Seite 131). Die Fortsetzung der Elution für weitere 12 Stunden erhöhte die Ausbeute nicht wesentlich. Die Gesamtausbeute der analytischen Elektroelution an p85 war ca. 75% des eingesetzten p85.

Nach der präparativen Elektroelution wurden 76% des markierten p85 und 1.5% des gesamten eingesetzten Proteins der Membranfraktion erhalten. Die aus der Elektroelution resultierenden Proben wurden entweder durch Aceton-Präzipitation oder Lyophilisation für die isoelektrische Fokussierung (IEF) vorbereitet. 700 - 600µg des elektroeluierten Proteins wurden für eine 2D-Elektrophorese verwendet. Dabei wurden mindestens 29% der eingesetzten Radioaktivität nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese im Gel in Form eines radioaktiven Fleckes erhalten (Abbildung 55, Seite 132). Der im Autoradiogramm sichtbare Fleck deckte sich teilweise mit einem durch Coomassie-Blau angefärbten Proteinfleck. Bei manchen Elektrophoresen wurde ein Teil der eingesetzten Radioaktivität am Startpunkt der isoelektrischen Fokussierung gefunden. Nach Beendigung der zweiten Dimension, der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, wurden die Proteine direkt auf Nitrozellulose übertragen. Die Ausbeute des Proteintransfers wurde nicht bestimmt.

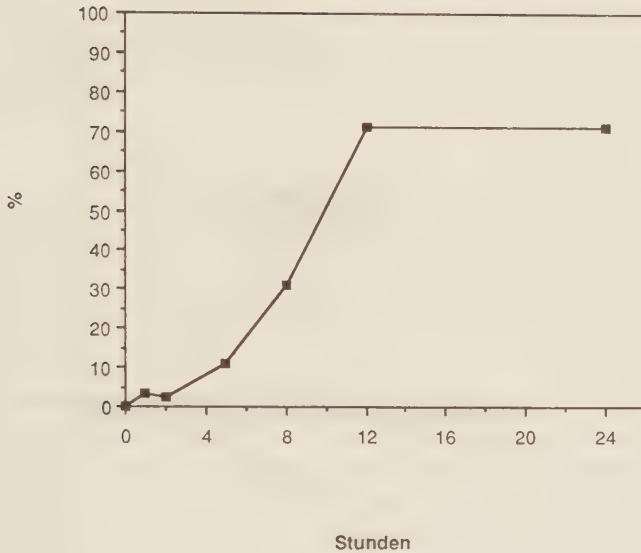


Abbildung 54

Elektroelution von p85. Etwa 810 μ g des Natriumkarbonatsedimentes wurden mit [3'-³²P]PAPS inkubiert (siehe 3.5.). Das markierte Material wurde mit ca. 20mg unmarkiertem Natriumkarbonatsediment vermischt und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde unfixiert getrocknet und anschließend autoradiographiert. Danach wurden die Proteine, die sich in dem Gelstreifen befanden, elektroeluiert (siehe 3.3.5.). Nach 1, 2, 5, 8, 12 und 24 Stunden (bei 4°C) wurden Proben aus der Elutionskammer gezogen und die in ihnen enthaltene Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Nach Beendigung des Versuches wurden die Gelstücke getrocknet und danach ihre Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. 71% der Radioaktivität waren eluiert worden. Die zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmte Radioaktivität im Eluat wurde in Beziehung zu diesem Wert umgerechnet. Die Abbildung beruht auf diesen Werten.

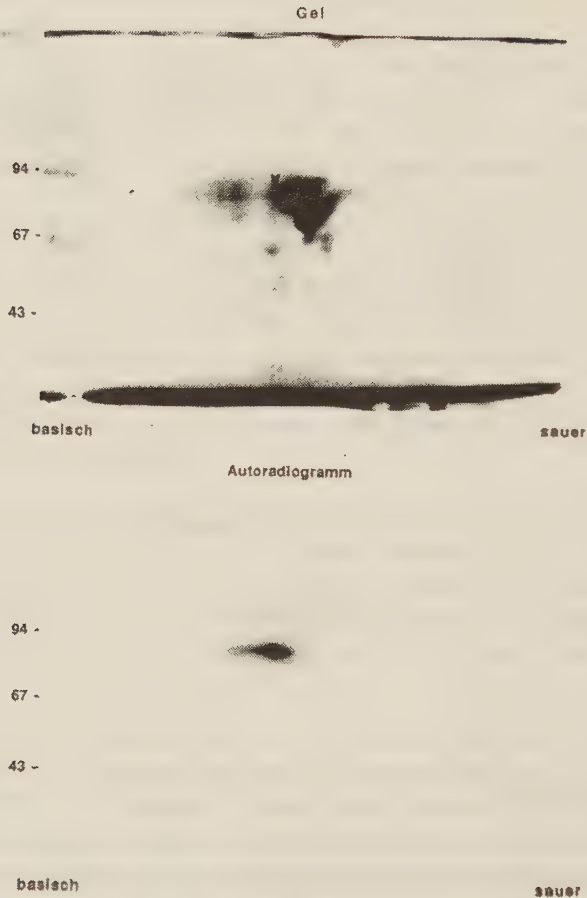


Abbildung 55

IEF/SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des Elektroeluats. 400µl des Elektroeluates (560µg Protein) wurden durch IEF in einem pH-Bereich von 3.5 - 9.5 in der 1. Dimension und mit SDS-PAGE in der 2. Dimension aufgetrennt (siehe 3.3.3.). Das resultierende Gel wurde durch Autoradiographie analysiert. Das Autoradiogramm, sowie das mit Coomassie Blau gefärbte Gel sind gezeigt. Der Pfeil deutet auf einen Proteinfleck, welcher sich mit dem Fleck auf dem Autoradiogramm deckt.

Die Ausbeute an gesamten Protein und markiertem p85, der auf die Natrium-karbonatbehandlung folgenden Schritte, ist in Abbildung 53, Seite 129, zusammengefasst.

5.5.2. Immunisierung von Mäusen mit aufgereinigtem p85

Nachdem die Proteine auf Nitrozellulose übertragen worden waren, wurde die Filter an der Luft getrocknet und anschließend autoradiographiert. Das Autoradiogramm wurde benutzt, um radioaktiv markiertes p85 zu lokalisieren und auszuschneiden.

Für die erste Immunisierung wurde ein Nitrozellulosestück direkt in das Bauchfell einer Maus implantiert. Das Protokoll der zweiten und dritten Immunisierung, die jeweils im Abstand von etwa 2 Wochen folgten, war anders. Das Nitrozellulosestück, welches p85 enthielt, wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend mit einem Mörser pulverisiert. Das resultierende feine Pulver wurde in PBS aufgenommen und injiziert. Zwei Tage nach der dritten Injektion wurde die Maus getötet, die Milz entnommen und mit Myelomzellen fusioniert (Köhler und Milstein, 1975). Dazu wurde die Milz halbiert und je eine Hälfte mit der Myelomzelllinie SP101, bzw. X63-Ag8.653, fusioniert (Niehrs, persönliche Mitteilung). (Die Fusion wurde dankenswerterweise von Herrn C.Niehrs und Frau U.Weiß, die später auch die Kultivierung der Klone übernahm, durchgeführt.)

Zur Analyse der Hybridom-Klone wurde 20K-Sediment oder Detergenzphase einer Triton X-114-Kondensation ausgehend vom 20K-Sediment der Rindernebbenniere durch SDS/PAGE aufgetrennt und direkt auf Nitrozellulose übertragen. Es wurden sowohl unmarkierte Fraktionen als auch [3^H - ^{32}P]PAPS markierte Fraktionen verwendet. Die resultierenden Nitrozellulosestreifen wurden dann mit Überständen der Hybridom-Klone inkubiert. Gebundene Antikörper wurden entweder mit an Kaninchen-anti-Maus Ig-G gekoppelter Peroxidase nachgewiesen oder durch Verwendung von [^{125}I] Jod markiertem Schaf anti-Maus IgA nachgewiesen. Keiner, der nach der beschriebenen Methode getesteten Hybridom-Überstände, produzierte einen Antikörper gegen p85.

5.6. Diskussion

5.6.1. Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit [3'-³²P]PAPS.

Die Bedingungen für die Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit [3'-³²P]PAPS waren so gewählt, daß bei einer angenommenen Markierungseffizienz von 1% des markierbaren Proteins, ein Protein mit einer Abundanz von 1:100,000 (w/w) noch nachweisbar gewesen wäre. Trotzdem gelang es nicht durch direktes Photoaffinitätsmarkieren ein PAPS-bindendes Golgi-Membranprotein zu identifizieren. Mögliche Gründe hierfür sind :

- 1.) Die Abundanz der gesuchten Proteine ist geringer als angenommen. Dies ist unwahrscheinlich, da die N-Heperansulfotransferase durch 65,000fache Anreicherung gereinigt werden konnte (Brandan und Hirschberg, 1988) und vergleichbare Golgi-Enzyme, wie die Galaktosyltransferase (Strous, 1986), eine vergleichbare Abundanz haben.
- 2.) Die Markierungseffizienz ist kleiner als 1%. Dies könnte mehrere Ursachen haben. Zwar ist der Mechanismus der Photoreaktion wenig verstanden, doch gibt es Beobachtungen, daß der photoaktivierte Purin- bzw. Pyrimidinring mit verschiedenen Aminosäuren unterschiedlich effizient reagiert (Schott und Shetlar, 1974). Da die photoaktivierte Verbindung nur eine sehr kurze Lebensdauer hat, kann sie nur mit Aminosäuren in der unmittelbaren Nachbarschaft reagieren. Deshalb ist die Markierungseffizienz sehr stark abhängig von der Struktur der Bindungsstelle und kann nicht vorhergesagt werden. Ferner ist zu berücksichtigen, daß geknüpfte Verbindungen während der Analyse des Proteins wieder gebrochen werden können.

Die Wahrscheinlichkeit, daß durch Erhöhung der spezifischen Aktivität von [3'-³²P]PAPS oder durch die Erhöhung der Konzentration von [3'-³²P]PAPS im Reaktionsansatz die Identifizierung von PAPS-bindenden Golgi-Membranproteinen gelingen könnte, wird als gering eingeschätzt, nicht zuletzt, weil es nicht gelungen war, in den am höchsten aufgereinigten Membranfraktionen der Rindernebenniere (Detergenzphasen nach Triton X-114 Kondensation) solche Proteine nachzuweisen. Daher erscheint es wenig sinnvoll, die Versuche PAPS-bindende Golgi-Membranproteine durch direktes Photoaffinitätsmarkierung mit [3'-³²P]PAPS zu identifizieren, fortzusetzen. Sinnvoller

wäre die Verwendung von reaktiven oder photoaktivierbaren PAPS-analogen Verbindungen.

Das lösliche 34kDa (p34) Protein, welches vorwiegend in zytoplasmatischen Fraktionen der Rindernebenniere durch Einstrahlung von UV-Licht markiert wurde, wurde nicht weiter charakterisiert. P34 könnte eine Sulfotransferase oder ein CoA-bindendes Protein unbekannter Funktion sein. Jedoch läßt die Aufreinigung einer Steroidsulfotransferase aus Rattenleber, mit einem Molekulargewicht von 32kDa, die erste Möglichkeit als die wahrscheinlichere erscheinen (Takikawa et al., 1986).

5.6.2. p85 wird durch Übertragung der 3'-Phosphatgruppe von PAPS phosphoryliert.

Im Gegensatz zu p34 wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von 85kDa (p85) in mikrosomalen Fraktionen verschiedener Gewebe und klonaler Zelllinien unabhängig von der Einstrahlung von UV-Licht durch Inkubation mit [$3'$ - ^{32}P]PAPS radioaktiv markiert. Dabei war die radioaktive Markierung von p85 kovalenter Natur:

- 1.) Weder Kochen in SDS-Probenpuffer noch TCA-Präzipitation machten die Markierung von p85 wieder rückgängig.
- 2.) Nach tryptischem Verdau und totaler Hydrolyse der resultierenden Peptide in 6N HCL war eine radioaktiv markierte Aminosäure, nämlich Serin, nachweisbar.
- 3.) Die Reelektrophorese von markiertem p85 führte nicht zu einem nennenswerten Verlust an radioaktiver Markierung.

Außerdem war die radioaktive Markierung von p85 durch [$3'$ - ^{32}P]PAPS ein hoch spezifischer Prozeß:

- 1.) Die Denaturierung des Proteins durch Kochen, TCA-Präzipitation oder SDS bei einem pH-Wert von unter 5.4, verhinderte die Markierung von p85.
- 2.) Die Anwesenheit der 3'-Phosphatgruppe am Ribosering und der Sulfatgruppe waren unbedingte Voraussetzung für die Markierung von p85. Zum einen konkurrierten nur Nukleotide mit einer 3'-Phosphatgruppe am Ribosering wirksam mit PAPS um die Bindung an p85, zum anderen wurde p85 nicht durch [$3'$ - ^{32}P]PAP markiert.

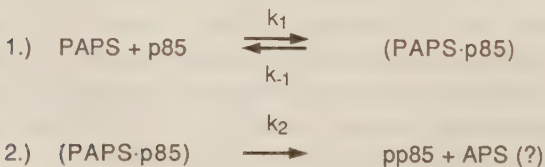
- 3.) Nach chymotryptischem Verdau konnten nur zwei radioaktiv markierte Peptide mit ähnlichen Laufverhalten nachgewiesen werden. Da das eine Peptid wahrscheinlich durch stärkern Verdau aus dem anderen Peptid hervorgegangen ist, ist p85 vermutlich nur in einer Position von $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markiert .

Die Markierung von p85 war nicht nur spezifisch für PAPS, sondern auch spezifisch für $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$. PAPS mit anderen radioaktiven Resten wie $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$, $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ oder $[2,5',8\text{-}^3\text{H}]\text{PAPS}$ markierten p85 nicht oder mit so geringer Effizienz, daß markiertes p85 nicht nachweisbar war. Daher ist die 3'-Phosphatgruppe der einzige Rest von PAPS, dessen Übertragung auf p85 nachgewiesen werden kann. Damit ist p85 das erste bekannte Protein, welches durch PAPS phosphoryliert wird. Bisher war PAPS nur als Sulfat-donor bekannt (Mulder, 1981).

Die Phosphorylierung von p85 erfolgte an der Aminosäure Serin und war unabhängig vom pH-Wert der Reaktionslösung. Bereits die chemische Charakterisierung der Phosphatbindung schloß andere Aminosäuren, mit Ausnahme von Serin, aus. So ist es unwahrscheinlich, daß der Nachweis von radioaktiv markiertem Serin nach tryptischem Verdau und totaler Hydrolyse in 6N HCL bei 110°C durch das Springen des Phosphates von einer anderen Aminosäure zustande kam.

5.6.3. p85 wird intermediär phosphoryliert

Die Phosphorylierung von p85 war reversibel. Erst nach der Denaturierung von p85, durch verschiedene Methoden, konnte die Phosphorylierung stabilisiert werden und nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Obwohl der genaue Ablauf der Reaktion noch nicht aufgeklärt wurde, kann der Reaktionszyklus in erster Näherung, wie folgt beschrieben werden:





Die mögliche Bildung eines Komplexes aus p85 und den Reaktionsprodukten wurde nicht berücksichtigt, da die Reaktion in den meisten Fällen abgebrochen wurde, bevor nennenswerte Mengen an PAPS verbraucht worden waren. Ob das Reaktionsprodukt der zweiten Teilreaktion APS oder ein anderes Abbauprodukt von PAPS ist, muß noch geklärt werden. Bisher konnte eine durch p85 bewirkte Hydrolyse der Phosphosulfatbindung noch nicht nachgewiesen werden. Nach der Dephosphorylierung von p85 (3) kann der Reaktionszyklus mit der Bindung von PAPS an p85 (1) erneut beginnen.

Nach diesem Modell wird die Markierungseffizienz von p85 neben der Konzentration von PAPS und markierbarem p85 vor allem durch das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Phosphorylierungsreaktion (k_2) und Dephosphorylierungsreaktion (k_3) bestimmt. Dabei ist die Markierungseffizienz um so größer, je größer k_2 im Vergleich zu k_3 ist. Deshalb kann eine Erhöhung der Markierungseffizienz theoretisch durch Vergrößerung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit oder durch Verlangsamung der Dephosphorylierungsreaktion bewirkt werden. Eine Kombination beider Faktoren führt zu einer zusätzlichen Verstärkung dieses Effektes. So lassen sich die großen Unterschiede, die in der Markierungseffizienz von p85 in den verschiedenen Geweben und Zelllinien beobachtet wurden, als eine Kombination aus unterschiedlichen Mengen an markierbarem p85 und unterschiedlichem Verhältnis von k_2 zu k_3 erklären. Auch das Ansteigen der Markierungseffizienz bei sinkenden pH-Werten der Reaktionslösung läßt sich auf eine Veränderung von k_2 zu k_3 zurückführen und spiegelt wahrscheinlich nicht das physiologische Optimum des Systems wieder.

Nur wenn das Reaktionssystem mit PAPS übersättigt wird, kann von der Markierungseffizienz auf die Menge an markierbarem p85 geschlossen werden. Das entsprechende Experiment mit 0.5/1.5M Interphase der Rindernebenniere ergab eine Abundanz von p85 von 1:20,000 (w/w) in der betreffenden Fraktion. Unter Berücksichtigung eines, aus den Proteinwerten geschätzten, Aufreinigungsfaktors von 5 gegenüber dem Homogenat ergibt sich eine Abundanz von p85 von 1:100,000 im Homogenat. Dies ist die Abundanz, die für die Sulfotransferasen oder den PAPS-Translokator bei der Planung der

Photoaffinitätsmarkierungsexperimente zu Grunde gelegt wurde. Da die Markierungseffizienz von p85 unter Standardbedingungen etwa 10% des markierbaren p85 beträgt, ist sie zehnmal so groß wie die Markierungseffizienz, die für die Photoaffinitätsmarkierungsexperimente angenommen wurde. Deshalb war es kein Problem p85, selbst im Homogenat, nachzuweisen.

Hinweise auf die "Aktivität" von p85, nämlich die Anzahl der Reaktionszyklen pro Zeiteinheit, wurden durch Analysen des Zeitverlaufes der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktion gewonnen. Dabei wurde festgestellt, daß die Phosphorylierungsreaktion so schnell erfolgte, daß sie mit den verwendeten Analysenmethoden zeitlich nicht mehr aufgelöst werden konnte. Schon nach 1-2 Sekunden befand sich das System im "steady state" Zustand, in dem sich die Konzentration von phosphoryliertem p85 nicht mehr änderte. Obwohl die Dephosphorylierungsreaktion nicht unter Standardbedingungen gemessen werden konnte, sondern bei einer einhundertmal höheren PAPS-Konzentration, erfolgt sie wahrscheinlich ebenso schnell wie die Phosphorylierungsreaktion. Dies wird durch die experimentelle Beobachtung unterstützt, daß die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung annähernd gleich der Geschwindigkeit der Degradation von PAPS durch eine 3'-Nukleotidase war. Insgesamt läßt sich daraus schließen, daß der Reaktionszyklus von p85 *in vitro* in weniger als 1 Sekunde abgeschlossen ist. Somit ist p85 so aktiv, daß der Verbrauch von PAPS durch p85 direkt meßbar sein müßte.

Die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktion von p85 erfolgen autokatalytisch. Die Geschwindigkeiten beider Reaktion verändern sich im Rahmen der Meßmöglichkeit nicht wesentlich durch Verdünnung und Zugabe von SDS. Ferner kann p85 auch dann noch phosphoryliert werden, wenn es durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese partiell aufgereinigt wurde. Die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung wurde in diesen Experimenten nicht untersucht. So ist zumindest für die Phosphorylierungsreaktion die Möglichkeit ausgeschlossen worden, daß p85 ein Teil eines SDS-stabilen Proteinkomplexes ist, bei dem die Kinaseaktivität auf einer anderen Untereinheit als p85 liegt. Deshalb ist p85 wahrscheinlich ein monomeres Protein.

Alle bisher gewonnenen Daten sprechen dafür, daß das phosphorylierte p85 ein Reaktionsintermediat ist, vergleichbar der Phosphorylierung der Transport-ATPasen. Diese Deutung würde erklären, warum bisher außer p85 kein anderes Protein konsistent mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markiert wurde.

5.6.4. Mechanismus der Phosphorylierung von p85

p85 wird wahrscheinlich durch Übertragung der 3'-Phosphatgruppe von PAPS intermediär phosphoryliert, wobei die Reaktion durch p85 selbst katalysiert wird. In dieser Beziehung verhält sich p85 wie eine für PAPS-spezifische 3'-Nukleotidase. Dabei kann über den Mechanismus der Reaktion nur spekuliert werden. Intuitiv würde man vermuten, daß die Reaktion durch die Hydrolyse der Phosphosulfatbindung getrieben würde. Bisher konnte jedoch die durch p85 bewirkte Hydrolyse der Phosphosulfatbindung nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde eine 3'-Nukleotidase Aktivität nach Inkubation von durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese partiell aufgereinigtem p85 mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ nachgewiesen. Im Laufe der Reaktion konnte die Freisetzung von radioaktivem Phosphat nachgewiesen werden. Ob die 3'-Nukleotidase Aktivität mit p85 identisch ist, konnte nicht bewiesen werden. Jedoch gibt es mehrere Indizien, die es wahrscheinlich machen, daß die 3'-Nukleotidase Aktivität mit p85 identisch ist:

- 1.) Die 3'-Nukleotidase-Aktivität wurde nach der Inkubation von Gelstückchen, die Proteine des Molekulargewichtsbereiches von 67 - 94 kDa enthielten, mit $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ beobachtet.
- 2.) Die 3'-Nukleotidase war, wie p85, in SDS aktiv.
- 3.) Die 3'-Nukleotidase war spezifisch für PAPS, PAP wurde nicht als Substrat akzeptiert.
- 4.) In einem Experiment konnte keine 3'-Nukleotidase Aktivität und gleichzeitig keine Markierung von p85 nachgewiesen werden.

Sollte p85 nur eine 3'-Nukleotidase Aktivität besitzen, dann wäre die Reaktion eine Umesterung. Wahrscheinlich wird die Reaktion in Richtung der Phosphorylierung von p85 durch den Umstand begünstigt, daß das Reaktionsprodukt APS keine Affinität für p85 besitzt. Dadurch wäre das Gruppenübertragungspotential der 3'-Phosphatgruppe (2 kJ unter Standardbedingungen) ausreichend, um die Reaktion zu treiben.

5.6.5. Die subzelluläre Lokalisation von p85

Die subzelluläre Lokalisation von p85 konnte nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden. Jedoch ist p85 wahrscheinlich im Golgiapparat lokalisiert.

Unzweifelhaft ist p85 ein integrales Membranprotein und kein zytoplasmatisches oder lösliches Protein, da es weder in Natriumkarbonat gelöst wird, noch in der wäßrigen Phase nach Triton X-114 Kondensation gefunden wird. Eine weitere Eingrenzung der Lokalisation ergibt sich aus der Modifikation von p85 mit komplexen Kohlenhydraten, die Sialinsäuren enthalten, wie durch Neuraminidaseverdau gezeigt wurde. Da Sialinsäuren erst im trans-Golgi an Kohlenhydratstrukturen gebunden werden, muß p85 entweder in diesem Kompartiment oder in einem Kompartiment lokalisiert sein, das mit dem trans-Golgi Kompartiment indirekt, durch Vesikeltransport, in Verbindung steht. Ebenfalls scheiden als mögliche Lokalisationsorte für p85 der Zellkern und die Mitochondrien aus. Als mögliche Lokalisationsorte von p85 verbleiben der Golgiapparat, das endosomale Kompartiment, die Lysosomen und die Plasmamembran.

Dies wurde durch die Immunisolierung von p85-haltigen Membranen mit einem monoklonalen Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil des polymeren IgA-Rezeptor bestätigt. p85 befand sich in denselben Vesikeln wie der polymere IgA-Rezeptor. Dies sind Vesikel des sekretorischen oder transzytotischen Transportweges. Eine weitere Eingrenzung der subzellulären Lokalisation von p85 war durch dieses Experiment nicht möglich.

Nach der subzellulären Fraktionierung von Rindernebennieren und Rattenleber wurde die meiste an p85 gebundene Radioaktivität (pro mg Protein) in den mit Golgi-Vesikeln angereicherten Fraktionen gefunden. Gleichzeitig erfolgte eine klare Trennung von lysosomalen Vesikeln. Jedoch ergab sich eine Diskrepanz bei dem Vergleich der Menge an markiertem p85 (pro Fraktion) und der Galaktosyltransferaseaktivität (pro Fraktion) der Rattenleber. Die Fraktion mit der größten Gesamtaktivität der Galaktosyltransferase war lediglich die Fraktion mit der zweitgrößten Menge an markiertem p85. Da jedoch der größte Anteil an markiertem p85 in derselben Fraktion wie die zweitgrößte Gesamtaktivität der Galaktosyltransferase gefunden wurde, ist p85 wahrscheinlich in demselben Kompartiment enthalten wie die Galaktosyl-

transferase. Das Ergebnis könnte durch die Existenz von zwei Populationen von Golgi-Vesikeln erklärt werden. Dabei müßte die eine Population eine geringere Dichte haben als die andere, damit beide durch die Zentrifugation getrennt werden können. Somit ist p85 wahrscheinlich ein Golgi-Membranprotein. Die endgültige Bestätigung dieser Annahme der subzellulären Lokalisation von p85 wird wohl nur durch immunzytochemische Methoden möglich sein.

5.6.6. p85, mehr als eine 3'-Nukleotidase?

Abschließend stellt sich die Frage, ob p85 eines der bekannten PAPS-bindenden Membranproteine, nämlich eine Golgi-Sulfotransferase oder der PAPS-Translokator, ist. Dabei kann die erste Möglichkeit, daß p85 eine Golgi-Sulfotransferase ist, relativ sicher ausgeschlossen werden:

- 1.) Eine durch p85 bewirkte Hydrolyse der Phosphosulfatbindung konnte nicht beobachtet werden.
- 2.) p85 ist das einzige Protein, das konsistent durch $[3'\text{-}^{32}\text{P}]\text{PAPS}$ markiert wurde, im Gegensatz dazu gibt es mehrere Sulfotransferasen, für verschiedene Substrate.
- 3.) Die PAPS-Bindungsstelle von p85 liegt wahrscheinlich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran, während die PAPS-Bindungsstelle der Sulfotransferasen wahrscheinlich auf der luminalen Seite der Membran liegt.

Die zweite Möglichkeit, daß p85 der vermutete PAPS-Translokator ist, konnte nicht so einfach ausgeschlossen werden. Für diese Möglichkeit sprach:

- 1.) Die PAPS-Bindungsstelle von p85 liegt wahrscheinlich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran.
- 2.) p85 ist ein Transmembranprotein, da die PAPS-Bindungsstelle wahrscheinlich zum Zytoplasma hin orientiert ist und p85 wahrscheinlich glykosyliert ist, was luminaire Proteindomänen voraussetzt.

Jedoch ist die Übertragung der 3'-Phosphatgruppe von PAPS auf p85 völlig unvereinbar mit dem vorgeschlagenen Mechanismus der PAPS-Translokation (Capasso und Hirschberg, 1984), der einen Antiport von PAPS gegen 3'-AMP vorsieht, ohne daß PAPS während des Transportvorganges modifiziert wird. So kann p85 außer der Abspaltung der 3'-Phosphatgruppe von PAPS keine

weitere Funktion zugeordnet werden. Dabei sollte in Erwägung gezogen werden, daß p85 keines der bekannten PAPS-bindenden Golgi-Membranproteine, sondern ein bisher unbekanntes PAPS-bindendes Golgi-Membranprotein ist, das als 3'-Nukleotidase eine noch nicht erkannte Rolle im zellulären PAPS-Metabolismus spielt.

5.6.7. Aufreinigung von p85

Die Aufreinigung von p85 zur Homogenität wurde angestrebt, um mit Hilfe der Antikörper die subzelluläre Lokalisation von p85 zu bestimmen und die Funktion von p85 weiter aufzuklären. Jedoch schlug der Versuch monoklonale Antikörper mit von 2D-Gelen gewonnenem reinem p85 zu erzeugen fehl. Wahrscheinlich war die Immunogenität von p85 nicht groß genug, um mit den injizierten Mengen an p85 die Produktion von Antikörpern anzuregen.

5.6.8. Ausblick

Eine Fortführung der Arbeit scheint auf zwei Wegen möglich:

- 1.) Die Aufreinigung von p85 könnte fortgesetzt werden. Dabei sollte vor allem versucht werden, die Ausbeute an reinem p85 zu steigern. Neben der Produktion von monoklonalen Antikörpern, zur Klärung der subzellulären Lokalisation von p85, könnte mit dem gereinigten p85 die biochemische Charakterisierung, unter definierten Bedingungen, fortgesetzt werden
- 2.) Die Identifizierung und Charakterisierung anderer PAPS-bindender Membranproteine könnte versucht werden, um zu klären, ob p85 eine Rolle im Prozess der Sulfatierung im Golgi-Komplex spielt. Dies könnte unter Verwendung chemisch aktivierter oder photoaktivierbarer PAPS-analoger Verbindungen verwirklicht werden.

6. LITERATUR

- Alexander, P., Moroson, H.L. , "Cross - linking of deoxyribonucleic acid to protein following ultraviolet irradiation of different cells", (1962), *Nature*, 194, 882 - 883.
- Althaus, F.R., Richter, C. , "ADP-ribosylation of Proteins: Enzymology and biological significance ", (1987), *Springer Series on Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 37.
- Antonoff, R.S., Ferguson, J.J. , "Photoaffinity labeling with cyclic nucleotides", (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 3319 - 3321.
- Baddiley, J., Buchanan, A. , "Synthesis of "active" sulphate.", (1957), *Proc. Chem. Soc. (London)*, p. 147.
- Baeuerle, P.A., Huttner, W.B. , "Tyrosine sulfation is a trans-Golgi specific protein modification", (1987), *J. Cell. Biol.*, 105, 2655 - 2664.
- Banks, G.R., Sedgwick, S.G. , "Direct ATP photolabeling of Escherichia coli RecA proteins: Identification of regions required for ATP binding", (1986), *Biochem.*, 25, 5882 - 5889.
- Bernstine, E.G., Hooper, M.L., Grandchamp, S., Ephrussi, B. , "Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma", (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3899 - 3903.
- Blanquet, S., Dessen, P., Kahn, D. , "Properties and specificity of methionyl-tRNA^{Met} formyltransferase from Escherichia coli", (1984), *Methods Enzymol.*, 106, 141.
- Bordier, C. , "Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution", (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 1604 - 1607.
- Bradford, M.M. , "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, using the principle of dye-binding", (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248 - 254.
- Brandan, E., Hirschberg, C.B. , "The purification of a rat liver N-Heperan Sulfate Sulfotransferase", (1987), *J. Cell. Biol.*, 105, 76a.
- Burnell, J.N., Roy, A.B. , "Purification and properties of the ATP sulphurylase of rat liver", (1978), *Biochim. Biophys. A.*, 527, 239 - 248.
- a) Capasso, J.M., Hirschberg, C.B. , "Effect of Atractylosides, Palmitoyl Coenzyme A, and anion transport inhibitors on translocation of nucleotide sugars and nucleotide sulfate into Golgi vesicle", (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 4263 - 4266.

- b) Capasso, J.M., Hirschberg, C.B. , "Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: Evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane", (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7051 - 7055.
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K. , "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis", (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 1102 - 1106.
- Corbin, J.D., Hardman, J.G. , "Protein Kinases", (1983), *Methods Enzymol.*, 99
- Czarnecki, J., Geahlen, R., Haley, B. , "Synthesis and use of azido photoaffinity analogs of Adenine and Guanine nucleotides", (1979), *Methods in Enzymol.*, 56, 642 - 653.
- Daley, L.A., Renosto, F., Segel, I.H. , "ATP sulfurylase-dependent assays for inorganic pyrophosphatase: applications to determining the equilibrium constant and reverse direction kinetics of the pyrophosphatase reaction, magnesium binding to orthophosphate, and unknown concentrations of pyrophosphate", (1986), *Anal. Biochem.*, 157, 385 - 395.
- Denner, W.H.B., Stokes, A.M., Rose, F.A., Dodgson, K.S. , "Separation and properties of the soluble 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate-degrading enzymes of bovine liver", (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 315, 394.
- Farrel, D.F., Mc Khan, G.M. , "Characterisation of cerebroside sulfotransferase from rat brain", (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 4694 - 4702.
- Fatemi, S.H., Leblond, C.P. , "Sulfation and transport of basement membrane proteoglycans, as visualized by [35-S]sulfate radioautography in the endodermal cells of the rat parietal yolk sac", (1985), *Americ. J. Anatomy*, 173, 127 - 145.
- Figura, v.K., Hasilik, A. , "Lysosomal enzymes and their receptors", (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 167 - 193.
- Fleischer B. , "The Nucleotide Content of Rat Liver Golgi Vesicles", (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, 212, 602 - 610.
- Fleischer, B., Zambrano, F. , "Golgi apparatus of golgi kidney", (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 5995 - 6003.
- Freedman, V.H., Shin, S. , "Cellular Tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi solid medium", (1974), *Cell*, 3, 355 - 359.
- Frey, P.A., Richard, J.P., Ho, H.T., Brodx, S.R., Sammons, R.D., Sheu, K.F. , "Stereochimistry of selected phosphotransferases and nucleotidyltransferases", (1982), *Methods in Enzymol.*, 87, 213.

- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., Lazarow, P.B. , "Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum", (1982), J. Cell. Biol.,93, 97 - 102.
- Fujitaki, J.M., Smith, R.A. , "Techniques in the detection and characterization of Phosphoramidate-containing proteins", (1984), Methods in Enzym., 107, 23 - 35.
- Green, E.D., Halbeek, H., Boime, I., Baenziger, J.U. , "Structural elucidation of the disulfated oligosaccharide from bovine lutropin", (1985), J. Biol. Chem., 260, 15623 - 15630.
- Greene, L.A., Rein, G. , "Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells", (1977), Brain Research, 129, 247 - 263.
- Grinnell, F., Feld, M. , "Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium: Possible role of secreted fibronectin.", (1979), Cell, 17, 117 - 129.
- Hokin, L.E., Sastry, P.S., Galsworthy, P.R., Yoda, A. , "Evidence that a phosphorylated intermediate in a brain transport adenosine triphosphatase is an acyl phosphate", (1965), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 177 - 184.
- Howard, W., Denner, B., Stokes, A.M., Rose, F.A., Dodgson, K.S. , "Separation and properties of the soluble 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate-degrading enzymes of bovine liver", (1973), Biochim.Biophys. A., 315, 394 - 401.
- Howell, K.E., Ansorge, W., Gruenberg, J. , "Magnetic free flow immuno-isolation system designed for subcellular fractionation", (1988), in Microspheres and Drug Therapy, A.Rembaum and Z.Tokes, Editors, CRC Press, Boca Raton, Fl., 33 - 52.
- Howell, K.E., Palde, G.E. , "Hepatic Golgi fractions resolved into membrane and content subfractions", (1982), J. Cell. Biol., 92, 822 - 832.
- Hubbard S.C., Ivatt R.J. , "Synthesis and processing of asparagine linked oligosaccharides", (1981), Ann. Rev. Biochem., 50, 555 - 583.
- Huttner, W.B. , "Protein tyrosine sulfation", (1987), Trends Biochem. Sci., 12,361 - 363.
- Huttner, W.B., Baeuerle, P.A. , "Protein sulfation on Tyrosine", (1988), Modern Cell Biology, 6, 97 - 140.
- Inoue, H., Otsu, K., Yoneda A., Kimata, K., Suzuki, S., Nakanishi, Y. , "Glycosaminoglycan sulfotransferases in human and animal sera", (1986), J. Biol. Chem., 261, 4460 - 4469.
- Karlson, P. , "Kurztes Lehrbuch der Biochemie", (1984), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 263.

- Kim, Y.S., Perdomo, J., Nordberg, J. , "Glycoprotein synthesis in small intestine mucosa. I. A study of glycosyltransferases in microsomal subfractions", (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 5466 - 5476.
- Knowles, B.B., Howe, C.C., Aden, D.P. , "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen", (1980), *Science*, 209, 497 - 499.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975), "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.", *Nature*, 256, 495 - 497.
- Kolbe, H.V.J., Costello, D., Wong, A., Lu, R.L., Wohlrab, H. , "Mitochondrial phosphate transport", (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 9115 - 9120.
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. , "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides", (1985), *Ann. Rev. Biochem.* , 54, 631 - 664.
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. , "Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units.", (1980), Lenarz, W.J., (Hrsg.), *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*. New York Plenum Press., 1 -32.
- Laemmli, U.K. , "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", (1970), *Nature*, 227, 680 - 685.
- Lee, R.W.H., Huttner, W.B. , "Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 Pheochromocytoma cells and their sulfation by a Tyrosylprotein sulfotransferase", (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 11326 - 11334.
- Lee, R.W.H., Suchanek, C., Huttner, W.B. , "Direct photoaffinity labeling of proteins with Adenosine 3'-[32P]Phosphate 5'-Phosphosulfate", (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 11153 - 11156.
- Lee, R.W.H., Huttner, W.B. , "(Glu-62,Ala-30,Tyr-8)_n serves as a high -affinity substrate for tyrosylprotein sulfotransferase: A Golgi enzyme", (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 82, 6143 - 6147.
- Lewis, M.H.R., Spencer, B. , "The enzymatic degradation of nucleotide sulphato-phosphate anhydrides", (1962), *Biochem. J.*, 85, 18P.
- Liu, N., Baenziger, J.U. , "In vivo and in vitro sulfation of a membrane glycoprotein", (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 856 - 861.
- Low, M.G., Ferguson, M.A.J., Futerman, A.H., Silman, I. , " Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins." , (1986), *Trends Biochem Sci.*, 11, 212.
- Magee, A.I., Courtneidge, S.A. , "Two classes of fatty acylated proteins exist in eukaryotic cells", (1985), *EMBO J.*, 4, 1137 - 1144.

- Mc Khann, G.M., Merlin, L.M., Keenan, T.W. (1965), *Biochem., Biophys. Res. Comm.*, 20, 109.
- Merkle, R.K., Heifetz, A. , "Enzymatic sulfation of N-glycosidically linked oligosaccharides by endothelial cell membranes", (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, 234, 460 - 467.
- Miller, R.R., Waechter, C.J. , "Enzymatic sulfation of a large molecular weight glycoprotein associated with pig brain membrane", (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, 198, 31 - 41.
- Mulder, G.J. , "Sulfation of drugs and related compounds", (1981), CRC Press, Boca Rotan, Florida.
- Müller, G., Heilmann, H.H. , "Sulfatierte Makromoleküle des Bindegewebes und ihr Stoffwechsel", (1984), *Biomed. Biochem. Acta*, 43, 867 - 886.
- O'Farrell, P.H. , "High resolution two-dimensional electrophoresis", (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 4007 - 4021.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H. , "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins", (1977), *Cell*, 12, 1133 - 1142.
- Pal, P.K., Wechter, W.J., Colman, R.F. , "Affinity labeling of the inhibitory DPNH site of bovine liver glutamate dehydrogenase by 5'-flurosulfonyl adenosine", (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 8140 - 8147.
- Pennings, E.J.M., Kempen, G.M.J. , "Analysis of 3'-phosphoadenylylsulphate and related compounds by paired-ion high-performance liquid chromatography", (1979), *J. Chrom.*, 176, 478 - 479.
- Peterson, G.L. , "A simplification of the protein assay method of lowry et. al., which is more generally applicable", (1977), *Anal. Biochem.*, 83, 346 - 356.
- Pigiet, V., Conley, R.R. , "Isolation and characterisation of phosphothioredoxin from *Escherichia coli*", (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 1910 - 1920.
- Reggio, H.A., Palade, G.E. , "Sulfated compounds in the zymogen granules of the guinea pig pancreas", (1978), *J. Cell. Biol.*, 77, 288 - 314.
- Renosto, F., Seubert, P.A., Segel, I.H. , "Adenosine 5'-phosphosulfate kinase from *penicillium chrysogenum*", (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 2113 -2123.
- Robbins, P.W., Lipmann, F. , "Isolation and Identification of active sulfate", (1957), *J. Biol. Chem.*, 229, 837 - 845.
- Rohrback, M.S., Bodley, J.W. , "Photo-cross linking of Guanine nucleotides to the nucleotide binding site of elongation factor G.", (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, 183, 340 - 346.

- Rosen O.G., Krebs E.G. , "Protein Phosphorylation", (1982), (Book A and B) Cold Spring Harbour Lab.
- Roth, J., Berger, E.G. , "Immunocytochemical localisation of galactosyltransferase in HeLa cells: Codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae.", (1982), J. Cell. Biol., 93, 223 - 229.
- Roy, A.B. , "Sulfotransferases", (1981), in Mulder, G.J., "Sulfation of drugs and related compounds", CRC Press, Boca Raton, Florida, 83 - 130.
- Schauer, R. , "Sialic acids and their role as biological masks", (1985), Trends. Biochem. Sci. , 10, 357 - 360.
- Schiff, J.A., Hodson, R.C. , "The metabolism of sulfate", (1973), Annu. Rev. Plant. Physiol., 24, 381.
- Schott, H.N., Shetlar, M.D. , "Photochemical Addition of Amino Acids to Thymine", (1974), Biochem. Biophys. Res. Comm., 59, 1112 - 1116.
- Schwarz, J.K., Capasso, J.M., Hirschberg, C.B. , "Translocation of Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into rat liver Golgi vesicles", (1984), J. Biol. Chem, 259, 3554 - 3559.
- Sefton, B.M., Buss, J.E. , "The covalent modification of eukaryotic proteins with lipid", (1987), J. Cell. Biol., 104, 1449 - 1453.
- Seubert, P.A., Hoang, L., Renosto, F., Segel, I.H. , "ATP sulfurylase from *penicillium chrysogenum*: Measurements of the true specific activity of an enzyme subject to potent product inhibition and a reassessment of the kinetic mechanism", (1983), Arch. Biochem. Biophys., 225, 679 - 691.
- Shetlar, M.D. , "Cross-linking of proteins to nucleic acids by ultraviolet light", (1980), Photochem. Photobiol. Rev., 5, 105 - 197.
- Smith, K.C. , "Dose - dependent decrease in extractibility of DNA from bacteria following irradiation with ultraviolet light plus dye", (1962), Biochem. Biophys. Res. Comm., 8, 157 - 163.
- Solari, R., Kühn, L., Kraehenbuhl, J.P. , "Antibodies Recognizing different domains of the polymeric immunoglobulin receptor.", (1985), J. Biol.Chem., 260, 1141-1145.
- Sperling, J., Havron, A. , "Photochemical cross-linking of ATP to histone H4", (1976), Photochem. Photobiol., 23, 323 - 326.
- Strous, G. J. , "Golgi and secreted Galactosyltransferase", (1986), CRC, Cell Biol., 21, 119 - 151.

- Suissa, M. , "Spectrophotometric quantitation of silver grains eluted from autoradiograms", (1983), *Anal. Biochem.*, 133, 511 - 514.
- Sztul, E., Howell, K.E., Palade, G.E. , "Intracellular and transcellular transport of secretory component and albumin in rat hepatocytes", (1983), *J. Cell. Biol.*, 97, 1582 - 1619.
- Sztul, E.S., Howell, K.E., Palade, G.E. , "Biogenesis of the polymeric IgA Receptor in rat hepatocytes. II. Localisation of its intracellular forms by cell fractionation studies", (1985), *J. Cell. Biol.* , 100, 1255 - 1261.
- Sztul, E.S., Howell, K.E., Palade, G.E. , "Biogenesis of the Polymeric IgA Receptor in Rat Hepatocytes. I. Kinetic Studies of Its Intracellular Forms", (1985), *J. Cell. Biol.*, 100, 1248 - 1254.
- Taikikawa, H., Stolz, A., Kaplowitz, N. , "Purification of a 32.5kDa monomeric sulfotransferase from rat liver with activity for bile acids and phenolic steroids", (1986), *FEBS lett.*, 207, 193 - 197.
- Tashjian, A.H. , "Clonal strains of hormone producing pituitary cells.", (1979), *Methods Enzymol.*, 58, 527 - 535.
- Tennekoon, G., Zaruba, M., Wolinsky, J. , "Topography of cerebroside sulfotransferases in Golgi-enriched vesicles from rat brain", (1983), *J. Cell. Biol.*, 97, 1107 - 1112.
- Trifaró, J.M., Duerr, A.C. , "Isolation and characterisation of a Golgi-rich fraction from the adrenal medulla", (1976), *Biochim. Biophys. A.*, 421, 153 - 167.
- Tse, Y.C., Kirkegaard, K, Wang, J.C. , "Covalent bonds between proteins and DNA", (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 5560 - 5565.
- Tweedie, J.W., Segel, I.H. , "ATP-sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. 1. purification and characterisation", (1971), *Prep. Biochem.*, 90, 1.
- Ueda, K., Hayaishi, O. , "ADP-ribosylation", (1985), *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 73 - 100.
- Vaessen, R.T.M.J., Kreike, J., Groot, G.S.P. (1981), *FEBS Letter*, 124, 193 - 196.
- Varma, A.K., Nicholas, D.J.D. , "Purification and properties of ATP-sulphurylase from *Nitobacter agilis*.", (1971), *Biochim. Biophys. A.*, 227, 373.
- Wold, F. , "In Vivo Chemical Modification of Proteins (Post-Translational Modification)", (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 783 - 814.
- Young, R.W. , "The role of the Golgi complex in sulfate metabolism", (1973), *J. Cell Biol.*, 57, 175 - 189.

Yue, V.T., Schimmel, P.R. , "Direct and specific photochemical cross-linking of Adenosine 5'-triphosphate to an aminoacyl-tRNA synthetase", (1977), *Biochem.*, 16, 4678 - 4684.

Lebenslauf

Name: Ulrich Seydel

1958: 11. April, geboren in Bielefeld, Deutschland.

1964 - 77: Besuch der Schule in Bielefeld, Abitur 1977.

1977- 84: Studium der Chemie an den Universitäten von Hannover, Bielefeld und Göttingen.

Okt. 1982 - Jan. 1984: Göttingen, Diplomarbeit: die Arbeit wurde in dem Labor von Prof. Dr. Hoppe am Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen angefertigt. Der Titel der Arbeit lautete: "Studien über die electrophile Carbamoylierung von N,N-Diisopropylcarbamidsäure-2-alkenylestern". Datum der Diplomprüfung: 8. 2. 1984, Note: gut.

Mai 1984 - April 1988: München und Heidelberg, Doktorarbeit: die Arbeit wurde angefertigt in der Arbeitsgruppe von Dr. Huttner am Max-Planck Institut für Psychiatrie in Martinsried/München und ab September 1985 in derselben Gruppe am Europäischen Molekularbiologischen Laboratorium (EMBL) in Heidelberg. Der Titel der Arbeit lautet: "Phosphattransfer von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf p85, ein Membranprotein des Golgiapparates - eine neue kovalente Proteinmodifikation."

